

氏名(国籍)	BATTSETSEG, Badgar (モンゴル国)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第146号		
学位授与年月日	平成16年3月15日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	Studies on Development of Specific Molecular Detection Methods for Equine <i>Babesia</i> Parasites in Vector Ticks (マダニ体内のウマバベシア原虫分子の特異的検出 法の開発に関する研究)		
審査委員	主査	帯広畜産大学	教授 藤崎幸蔵
	副査	帯広畜産大学	教授 五十嵐郁男
	副査	岩手大学	教授 品川邦汎
	副査	東京農工大学	教授 本多英一
	副査	岐阜大学	教授 福士秀人

### 論文の内容の要旨

本研究は、ウマおよびラバ、ロバ、シマウマにおけるマダニ媒介性の原虫病であるウマバベシア症の病原体である赤血球内寄生原虫の *Babesia equi* および *B. caballi* について、媒介マダニ体内における特異的検出法を世界で初めて開発し、媒介マダニとウマバベシア原虫の宿主・寄生体関係に関する解明を図ったものである。第1章では、モンゴルの草原から採取した *Dermacentor nuttalli* 未吸血成ダニ体内における *B. equi* および *B. caballi* について、PCR および nested PCR 法を用いた検出法を開発し、その応用によって、モンゴルの *B. equi* および *B. caballi* は、*D. nuttalli* 体内での混合感染が一般的であり、また *D. nuttalli* は吸血によって両原虫を媒介する可能性が示唆された。第2章では、モンゴルの放牧ウマから採血するとともに、これに寄生していた *D. nuttalli* の部分あるいは完全飽血雌ダニを採取し、実験室内飼育によって卵と幼ダニを得て、*B. equi* および *B. caballi* 遺伝子の検出を nested PCR 法で試みた。その結果、*D. nuttalli* によるウマバベシア原虫の介卵伝播と卵から幼ダニへの経発育期伝播の可能性、また *D. nuttalli* がモンゴルにおけるウマピロプラズマ症の主要な媒介マダニとして、その流行と疫学に重要な役割を担っていることが明らかとなった。第3章では、ブラジルの2州において、放牧ウ

マ血液とこれに寄生しているオウシマダニ *Boophilus microplus* の幼・若・雌成ダニを採取し、飽血雌ダニからは実験室内飼育によって卵と幼ダニを得て、*B. equi* および *B. caballi* 遺伝子の検出を nested PCR 法で試みた。その結果、世界的にはウシ嗜好性とされる *Bo. microplus* が、ブラジルでは主要なウマ寄生マダニ種となっていること、*Bo. microplus* は *B. equi* および *B. caballi* に混合感染していること、*Bo. microplus* によるウマバベシア原虫の介卵伝播と経発育期伝播の可能性が高いこと、*Bo. microplus* はブラジルにおけるウマピロプラズマ症の主要な媒介マダニとして、その流行と疫学に重要な役割を担っていることが明らかとなった。第4章では、モンゴルとブラジルのバベシア感染ウマ血液ならびに *D. nuttalli* および *Bo. microplus* の各発育期から得られた EMA-1 遺伝子について、遺伝的多型性と系統発生に関する解析・比較を行った。その結果、少なくとも Mongolian variant、USDA variant、III-Florida variant の3多型が存在することと、ブラジルと米国の *B. equi* の起源が同一であることが初めて明らかにされた。一方、モンゴルの *B. equi* は各地の流行原虫株の原型というべき性状を保っている可能性が示唆された。以上、本研究は、世界各地の流行国におけるウマバベシア症の流行動態を分子疫学的に解明したものであり、今後、ウマバベシア症をはじめとする多くのマダニ媒介性疾病の発生予察に貢献をなすことが大いに期待される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ウマバベシア症は、ウマおよびラバ、ロバ、シマウマにおけるマダニ媒介性の原虫病である。病原体は赤血球内寄生原虫 *Babesia equi* および *B. caballi* であり、その流行地域はヨーロッパ、アフリカ、中近東、アジア、南アメリカなどの多くの国々に及んでいる。ほ乳類宿主における *Babesia* 原虫感染に関しては、赤血球内寄生原虫の形態学的観察法や、いくつかの抗原蛋白の組換え体を用いた ELISA や IDT などの免疫血清診断法、あるいは血液や組織臓器内の原虫遺伝子断片の検出法によって、動態や消長などの解明がすでに相当程度に進展している。しかし、媒介マダニ体内における *Babesia* 原虫に関しては、形態学的あるいは免疫学的検出が一部の発育期を除いて至難であり、このため原虫の存否、発育や動態に関してほとんど知見のない現状にある。このため、本研究では、モンゴルとブラジルの2流行地域において採取した媒介マダニを用いて、その体内におけるウマバベシア原虫分子の特異的検出法を開発するとともに、媒介マダニとウマバベシア原虫の宿主・寄生体関係について、本法を用いて解明を図った。

第1章においては、モンゴルのウマ放牧地(草原)から採取したカクマダニの1種 *Dermacentor nuttalli* 未吸血成ダニ体内における *B. equi* および *B. caballi* について、PCR および nested PCR 法を用いた検出法を開発した。*B. equi* の merozoite antigen 1 (EMA-1) 遺伝子断片に対し特異的なプライマーは *B. equi* に特異的であり、全ての *D. nuttalli* 成ダニのサンプルから PCR 産物を増幅できた。一方、*B. caballi* の BC48 遺伝子断片に対して特異的なプライマーは *B. caballi* のみ特異的であり、54 サンプル中7サンプルのダニにおいて PCR 産物を増幅できた。これらの検討によって、(1)モンゴルの *B. equi* および *B. caballi* は、*D. nuttalli* 体内での混合感染が一般的であり、また(2)*D. nuttalli* は吸血によって両原虫を媒介する可能性が示唆された。

第2章では、モンゴルの放牧ウマ血液とともに、ウマに寄生中の *D. nuttalli* の部分・完全飽血雌ダニを採取し、実験室内飼育によって卵と幼ダニを得た。これらについて *B. equi* (EMA-1) および *B. caballi* (BC48) 遺伝子の検出を nested PCR 法で試みた結果、両 *Babesia* DNA は、宿主ウマの血液やこれを吸血していた成ダニだけでなく、次世代の *D. nuttalli* の卵および幼ダニからも検出された。このことは、*D. nuttalli* によるウマバベシア原虫の介卵伝播と卵から幼ダニへの経発育期伝播の可能性を示していた。また、未寄生期、寄生期、そして次世代というあらゆる発育期の *D. nuttalli* から、ウマバベシア遺伝子が検出されたことから、*D. nuttalli* はモンゴルにおけるウマピロプラズマ症の主要な媒介マダニとして、その流行と疫学に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

第3章においては、ブラジルの放牧ウマ血液とともに、ウマに寄生しているオウシマダニ *Boophilus microplus* の幼・若・雌成ダニを採取し、飽血雌ダニからは実験室内飼育によって卵と幼ダニを得た。これらについて *B. equi* (EMA-1) および *B. caballi* (BC48) 遺伝子の検出を nested PCR 法で試みた結果、多くのウマ血液材料とすべての発育期の *Bo. microplus* 体内から両 *Babesia* 原虫の遺伝子が検出された。本研究によって、(1)世界的にはウシ嗜好性とされる *Bo. microplus* が、ブラジルでは主要なウマ寄生マダニ種と

なっていること、(2) *Bo. microplus* は *B. equi* および *B. caballi* に混合感染していること、(3) *Bo. microplus* によるウマバベシア原虫の介卵伝播と経発育期伝播の可能性が高いこと、(4) *Bo. microplus* はブラジルにおけるウマピロプラズマ症の主要な媒介マダニとして、その流行と疫学に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

第4章では、モンゴルとブラジルのバベシア感染ウマ血液ならびに *D. nuttalli* および *Bo. microplus* の各発育期から得られた *B. equi* の EMA-1 遺伝子について、米国の USDA 株、FLorida 株などを含めて、遺伝的多型性と系統発生に関する解析・比較を行った。その結果、EMA-1 遺伝子には関しては、少なくとも3つの多型が存在することを初めて明らかにすることができた。また、ブラジルの EMA-1 遺伝子配列が、米国の Florida 株のものと同じであり、また USDA 株とも高い相同性を示したことから、コロンプス以降に流行が始まったとされる両国の *B. equi* に関して、起源の同一性が EMA-1 遺伝子の性状の類似から初めて示唆された。一方、モンゴルの EMA-1 遺伝子は、比較したすべての系統と最も遠い関係にあり、モンゴルの *B. equi* が各地の流行原虫株の原型というべき性状を保っている可能性が示唆された。

本研究において、*B. equi* (EMA-1) および *B. caballi* (BC48) 遺伝子の検出を行う nested PCR 法が、媒介マダニ体内におけるウマバベシア原虫の存否と動態を検討するための特異的・高感度の手法として優れていることを明らかにし、さらに本法を用いて、モンゴル(旧北区)とブラジル(新熱帯区)においては、主要ウマ寄生マダニ種の *D. nuttalli* (モンゴル)あるいは *Bo. microplus* (ブラジル)種がそれぞれ *B. equi* と *B. caballi* に混合感染しており、ウマバベシア症の重要な媒介者としての役割を担っていることを初めて実証することができた。本研究で得られた成績は、今後世界のウマバベシア症の疫学研究に新しい方途を切り拓くものとして、大きな貢献をなすことが期待された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

## 基礎となる学術論文

- 1) 題 目: Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks  
著 者 名: Battsetseg, B., Xuan, X., Ikadai, H., Bautista, J.L.R., Byambaa, B., Boldbaatar, D., Battur, B., Battsetseg, G., Batskh, Z., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T. and Fujisaki, K.  
学術雑誌名: International Journal for Parasitology  
巻・号・頁・発行年: 31(4): 384 ~ 386, 2001
- 2) 題 目: Detection of equine *Babesia* spp. gene fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenov 1929 infesting Mongolian horses, and their amplification in egg and larval progenies  
著 者 名: Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F., Byambaa, B., Battur, B., Boldbaatar, D., Batsukh, Z., Khalounaa, T., Battsetseg, G., Igarashi, I., Nagasawa, H. and Fujisaki, K.  
学術雑誌名: Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年: 64(8): 727 ~ 730, 2002
- 3) 題 目: Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction  
著 者 名: Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F., Inoue, N., Alhassan, A., Kannno, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T. and Fujisaki, K.  
学術雑誌名: Veterinary Parasitology  
巻・号・頁・発行年: 107(4): 351 ~ 357, 2001

## 既発表学術論文

- 1) 題 目: Detection of antibodies to *Hypoderma lineatum* in cattle by Western blotting with recombinant hypodermin C antigen  
著 者 名: Boldbaatar, D., Xuan, X., Kimbita, E., Huang, X., Igarashi, I., Byambaa, B., Battsetseg, B., Battur, B., Battsetseg, G., Batsukh, Z., Nagasawa, H., Fujisaki, K. and Mikami, T.  
学術雑誌名: Veterinary Parasitology  
巻・号・頁・発行年: 9(2): 147 ~ 154, 2001
- 2) 題 目: Diagnosis of equine piroplasmiasis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens  
著 者 名: Xuan, X., Nagai, A., Battsetseg, B., Fukumoto, S., Makala, L.H., Inoue, N., Igarashi, I., Mikami, T. and Fujisaki, K.  
学術雑誌名: Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年: 63(10): 1159 ~ 1160, 2001

- 3) 題 目 : Molecular evidence of *Babesia caballi* (Nutall and Strickland, 1910) parasite transmission from experimentally-infected SCID mice to the ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901).  
 著者名 : Bautista, J.L.R., Ikadai, H., You, M., Battsetseg, B., Igarashi, I., Nagasawa, H. and Fujisaki, K.  
 學術雜誌名 : Veterinary Parasitology  
 卷・号・頁・発行年 : 102(3) : 185~191, 2001
- 4) 題 目 : Immune responses of interferon gamma (IFN-gamma) knock out mice to repeated *Haemaphysalis longicornis* (Acarti: Ixodidae) nymph infestations  
 著者名 : Battsetseg, B., Marniro, K., Inoue, N., Makala, L.H., Nagasawa, H., Iwakura, Y., Toyoda, Y., Mikami, T. and Fujisaki, K.  
 學術雜誌名 : Journal of Medical Entomology  
 卷・号・頁・発行年 : 39(1) : 173~176, 2002
- 5) 題 目 : Phenotype and function of murine discrete peyer's patch macropahge derived-dendritic cells  
 著者名 : Makala, L.H., Peyes, J.C.S., Nishikawa, Y., Tsushima, Y., Xuan, X., Huang, X., Battsetseg, B., Matsuo, T. and Nagasawa, H.  
 學術雜誌名 : Journal of Veterinary Medical Science  
 卷・号・頁・発行年 : 65(4) 491~499, 2003