

ダニによる寄生および感染症と生物多様性保全

野生動物のピロプラズマ原虫感染と
その進化系統解析平田晴之*¹ 陳内理生*^{1, 2} 倉田貴子*^{1, 2} 藤澤幸平*¹ 浅川満彦*³ 石原智明*¹

要 約

ピロプラズマ原虫は、赤血球に寄生するアピコンプレックス門に属する原虫で、溶血性貧血などを引き起こすダニ媒介性の原虫である。近年、ピロプラズマ目原虫は以前では分離できなかった野生動物やマダニ類からの原虫の検出が可能となり、新種の発見につながっている。本研究では我が国のアライグマにおけるピロプラズマ目原虫感染の状況を把握するために、北海道および関西地域で捕獲された野生のアライグマ 44 検体について nested PCR 法によってスクリーニングを行い、アライグマが保有する原虫の種類とそれぞれの感染率を調査、遺伝子解析およびその進化系統解析を行った。このことは野生動物から家畜や愛玩動物などへの感染拡大を防止し、その予防対策を講じるために重要である。

緒 論

ピロプラズマ原虫は、赤血球に寄生するアピコンプレックス門に属する原虫で、溶血性貧血などを引き起こすダニ媒介性の原虫である。様々な種の哺乳類と鳥類において感染が報告されているだけでなく、現在も新種の発見が相次いでおり、それらには遺伝子の突然変異や組み換え変異によってごく最近出現したと考えられているものもある^{1, 6, 14, 16, 17)}。近年、ピロプラズマ目原虫の分類に 18S rRNA 遺伝子などの一次塩基配列情報に基づいた進化系統

解析が用いられるようになり、以前では分離できなかった野生動物やマダニ類からの原虫の検出が可能となった。その結果、原虫の感染が報告されていなかった野生動物や、1 種ないし 2 種の原虫の感染しか報告されていなかった動物から、複数の原虫が検出されることになり、これが新種の発見につながっている¹⁰⁾。特に野生動物では様々なピロプラズマ種または genotype の重複感染報告が多くみられ²⁻⁴⁾、原虫を分離・クローニングすることによって生物性状を検討することは、野生動物から家畜や愛玩動物などへの感染拡大を防止し、その予防対策を講じるために重要である。

アライグマは北アメリカ原産の食肉目の外来生物で、日本には 1960 年代から 2000 年にかけて主にペットとして北アメリカから輸入された。その後野生化したアライグマが増加し、深刻な農業被害を生じている。さらに、アライグマは狂犬病¹⁸⁾・野兎病⁵⁾・レプトスピラ¹⁵⁾・トキソプラズマ⁹⁾・リケッチア¹⁸⁾・バベシア^{9, 11-13)}等の病原体の宿主として知られている。アライグマの増加がこれら病原体の、人と家畜動物への感染の危険性を増大するのではないかと指摘もある。ピロプラズマの研究領域でも、Telford と Goethert は北米のアライグマに感染しているピロプラズマ目原虫が、すでにスペインにおいて犬に溶血性貧血を引き起こす病原体として報告された *Theileria annae* と近い種であることを報告している^{7, 8, 20)}。そして、このことから彼らは、原虫が毛皮用に北米から移入されたアライグマによってヨーロッパから持ち込まれ、その後これが変異して *T. annae* が出現したのではないかと推測している⁸⁾。

酪農学園大学獣医学群獣医学類感染病理分野実験動物学ユニットの川淵および陣内らは 2004 年に道央圏で捕獲されたアライグマ 348 頭のピロプラズマ目原虫の感染状況を調査した¹¹⁾。調査の結果、①北米由来と考えられる

*¹Haruyuki HIRATA, Michio JINNAI, Takako KURATA, Kohei FUJISAWA & Chiaki ISHIIHARA: 酪農学園大学獣医学群獣医学類感染病理分野実験動物学ユニット

〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582

*²大阪府公衆衛生研究所

*³Mitsuhiko ASAKAWA: 酪農学園大学獣医学群獣医学類感染病理分野寄生虫病学ユニット

Babesia microti 様原虫⁸⁾, ②これまで報告のなかった新型原虫, および③秋田の犬に寄生していたダニから検出されたバベシア原虫に近縁な原虫¹⁰⁾, の大きく分けて3タイプの原虫が検出された。この調査では4歳以下の個体しか捕獲されなかったことから, これらのピロプラズマ目原虫の感染は, 日本で世代交代したアライグマに起こっていると考えられた。ただ, いずれも感染率が1%以下⁵⁾と, 北米アライグマの感染率90%¹⁾よりもはるかに低いため, これらの原虫が完全なライフサイクルを日本の自然の中で確立したとは言い難いと考えられた。しかし, 現在も感染が認められる以上, これらの原虫感染症が日本から消滅することはなく, やがて適応順化して感染が拡大する可能性が高いと川淵および陣内らは考察している^{11,13)}。

外来種によって国外から移入された病原原虫が日本在来のダニに順化する, あるいは日本在来のピロプラズマ原虫が外来種のアライグマに順化する可能性が示唆されたことは, 日本の食肉動物(野生動物, 家畜動物いずれにおいても)の原虫病対策にとって大きな問題である。さらに, アライグマの野生化は全国的な問題であり, 道央圏に限ったものではない。地域によって在来食肉動物の種類や分布が異なり, ダニの種類・分布も異なると考えられる。現時点で, どの様な原虫種がどこまで順化しているかを明らかにすることが重要で, 急務であると考えられる。

筆者は2004年から7年近くを経た現在, 道央圏だけでなく日本各地のアライグマにおけるピロプラズマ目原虫感染の状況を把握するために, 北海道および関西地方で捕獲された野生のアライグマ44検体について nested PCR 法によってスクリーニングを行い, アライグマが保有する原虫の種類とそれぞれの感染率を調査, 遺伝子解析およびその進化系統解析を行った。

方 法

1) アライグマの血液試料

アライグマの血液試料は, 2008年12月から2009年8月に北海道および関西地方で捕獲された野生のアライグマ44検体を使用した。

血液あるいは凝固血は頸動静脈および心臓から採取され, 4℃で当教室へ送付された。

2) 血液塗抹の作製

関西地方で捕獲されたアライグマの血液試料に関しては, 血液塗抹標本を作製した。血液塗抹標本は, メタノールで1分間固定し, 超純水で洗浄した後, ギムザ染色液(MERCK, German)で30分間染色した。染色終了後, 超純水で洗浄し, 室温で風乾させた。光学顕微鏡による観察は100倍油浸対物レンズを用いて行った。

3) アライグマの血液からの nested PCR 法を用いたピロプラズマ目原虫の検出

アライグマの血液約0.5mlをDNA抽出キット(DNA Extractor WB kit, 和光純薬㈱, 東京)を使用して, 取扱説明書に従いゲノムDNAを抽出した。この沈渣に30μLのTE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH7.5)に溶解した。

ゲノムDNAを材料として, ピロプラズマ目原虫の18S rRNA 遺伝子を広く検出するプライマーセットを用いて nested PCR を行い, 増幅を行った。PCR 反応溶液は, ゲノムDNAを1ng, 10 × La Taq buffer 2 μL, 2.5 mM dNTP 3.2 μL, 25 mM MgCl₂ 2 μL, dH₂O 10.8 μL, 5'側プライマーおよび3'R側プライマーを0.5 μLを混合し, さらに TaKaLa LA Taq ポリメラーゼ (TaKaRa Bio Inc., 日本)を0.2 μL加えてPCRを行った。

プライマーは以下のように設定した。

■ 18S rRNA 遺伝子を標的とした 1st PCR プライマー

Piro0F : 5'-GCCAGTAGTCATATGCTTGTGTGA-3'

Piro6R : 5'-CTCCTTCCTYTAAGTGATAAGGTTCCAC-3'

■ 18S rRNA 遺伝子を標的とした nested PCR プライマー

Piro1F-2 : 5'-CCATGCATGTCTWAGTAYAARCTTTTA-3'

Piro5.5R : 5'-CCTYTAAGTGATAAGGTTCAAAAACCT-3'

PCR 反応は, 93℃ 1分間を1サイクル, 93℃ 30秒間, 50℃ 40秒間, 72℃ 60秒間を30サイクル, 93℃ 30秒間, 55℃ 1分間, 72℃ 10分間を1サイクルの合計32サイクル行った。実験操作ミスに伴うDNAのコンタミネーションと人為的なDNA増幅エラーを防止するため, 上記のDNA抽出やPCR操作は専用の実験器具を用い, 隔離されたスペースで行った。また, サンプルの混和や分注などの操作はすべてフィルターチップを用いた。

PCR 反応終了後, PCR 産物はマーカーとともに1.0%ア

ガロースゲルを用いた電気泳動を行い、バンドの有無とサイズを確認した。得られた PCR 産物は再度電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、得られたバンドを切り出して、GENECLEAN II KIT (フナコシ㈱, 東京) を用いて精製した。

4) 塩基配列の決定

精製した DNA サンプルはサーマルサイクルシークエンズによって塩基配列の決定を行った。精製 DNA 1ng を計 5 μ L に H₂O でメスアップし、そこに各プライマー 1 μ L, DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter) 4 μ L を加えてサーマルサイクラーで反応させた。反応は、96°C 20 秒, 50°C 20 秒, 60°C 4 分を 30 サイクル行った。反応後のサンプルにストップソリューション (3M NaOAc 2 μ L, 100mM EDTA 2 μ L, Glycogen 1 μ L) を 1 サンプルにつき 5 μ L 入れ、エタノール沈殿後、遺伝子解析システム CEQ8000 (Beckman Coulter) へサンプルをセットして、その後の操作は説明書に従った。

5) PCR 産物のクローニング

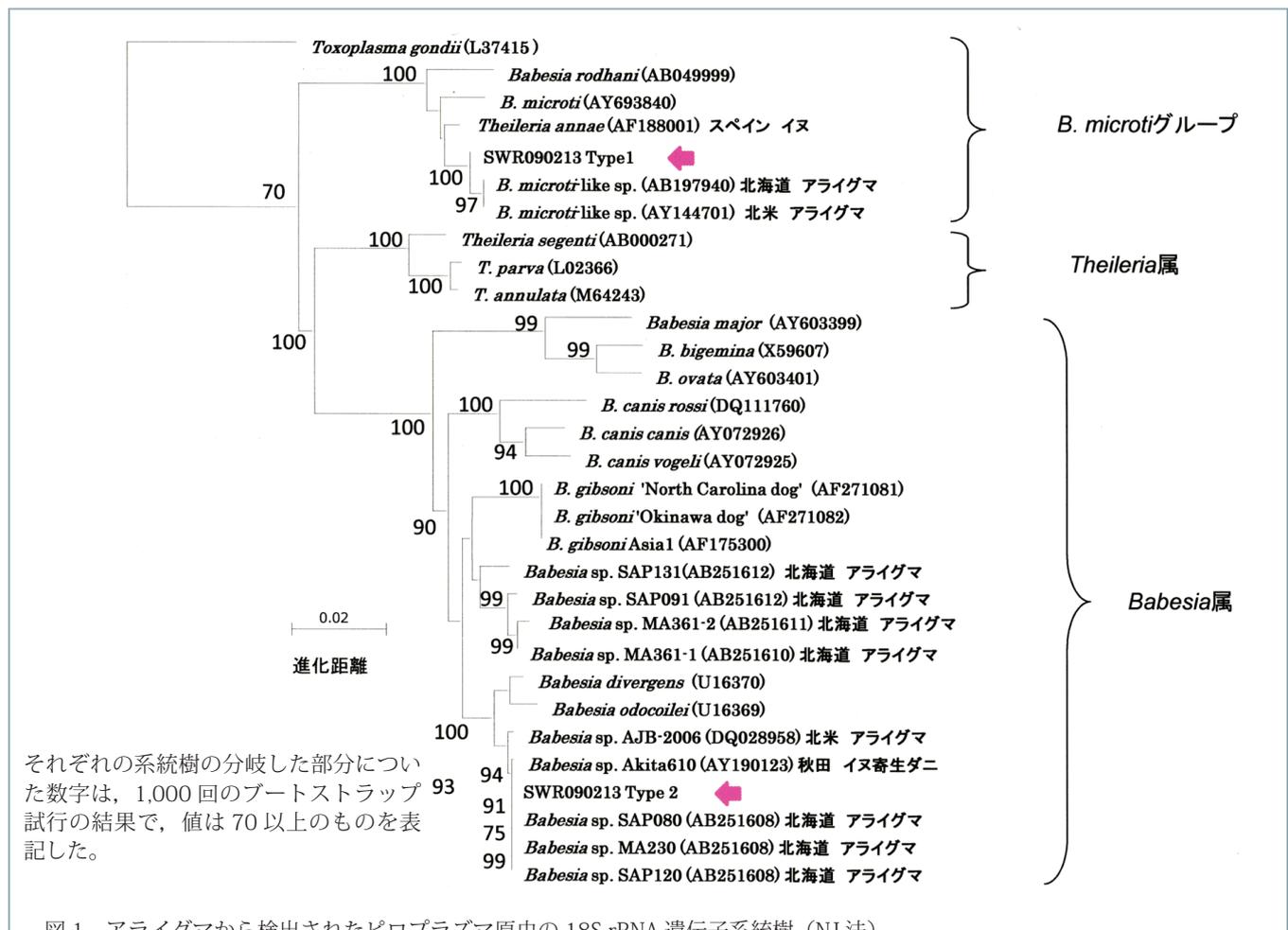
遺伝子解析の結果、ピロプラズマ目原虫の混合感染が強く疑われた場合、PCR 産物はクローニングを行った。PCR 産物のクローニングはプラスミドベクター pCR4-TOPO (Invitrogen, California, USA) にクローニングした。DNA 4ng に、pCR4-TOPO 1.0 μ L と Salt solution を 1.0 μ L 加えて 16°C で 18 時間反応させることでライゲーションを行った。ライゲーションした組み換え DNA はコンピテントセルとして用いた大腸菌 DH5 α に取り込ませトランスフォーメーションを行った。500 μ L の S.O.C. Medium (Invitrogen) を加え、37°C で 1 時間振とうした後、アンピシリン添加 LB 培地 (1% Bact trypton, 0.5% Yeast extract, 1.5% Bact agar, 0.5% NaCl) に塗布し、37°C で 18 時間培養した。形質転換されアンピシリン添加培地に発育したコロニーについてプラスミドのプライマーサイトを認識するプライマーを用いて PCR 反応を行い、インサートの有無を確認した。陽性プラスミド DNA は Endo Free Plasmid Maxi Kit (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) を用いて取扱説明書に従って精製した。精製したプラスミドは上述と同様に塩基配列を決定した。

6) 18S rRNA 遺伝子の塩基配列の遺伝子解析と進化系統解析

決定した塩基配列は GenBank より指標となるピロプラズマ原虫の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を入手して、共に CLUSTAL W Alignment program を用いて遺伝子解析を行った。

GenBank から入手した accession number は *Toxoplasma gondii* : L37415 (これをアウトグループとして用いた), *Babesia rodhaini* : AB049999, *B. microti* : AY693840, *B. microti*-like sp. 北米 アライグマ : AY144701, *Theileria annae* : AF188001, *B. microti*-like sp. 北海道 アライグマ : AB197940, *T. sergenti* : AB000271, *T. parva* : L02366, *B. major* : AY603399, *B. bigemina* : X59607, *B. obata* : AY603401, *B. canis rossi* : DQ111760, *B. canis canis* : AY072926, *B. canis vogeli* : AY072925, *B. gibsoni* 'Okinawa dog' : AF271082, *B. gibsoni* 'North Carolina dog' : AF271081, *B. gibsoni* Asia1 : AF175300, *Babesia* sp. SAP131 北海道 アライグマ : AB251612, *Babesia* sp. SAP091 北海道 アライグマ : AB251612, *Babesia* sp. MA361-1 北海道 アライグマ : AB251610, *Babesia* sp. MA361-2 北海道 アライグマ : AB251611, *B. dovergens* : U16370, *B. odocoilei* : U16369, *Babesia* sp. AJB-2006 北米 アライグマ : DQ028958, *Babesia* sp. Akita610 秋田 イヌ寄生ダニ : AY190123, *Babesia* sp. SAP080・MA230・SAP120 北海道 アライグマ : AB251608 である。

このアライメントの結果をもとに 18S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく進化距離を計算し、近隣結合法 (NJ 法) による系統樹を作製した。



結果

1) 血液試料の収集と保存

北海道および関西地域で捕獲されたアライグマの血液試料を44検体収集した。これら検体を遠心分離し、赤血球と血清をそれぞれ回収し使用するまで保存した。また、血液塗沫を作製し原虫の観察を行ったが顕微鏡下では見つかることはできなかった。

アライグマ由来バベシア原虫の感染率と生物学的系統分類の解析アライグマ血液よりゲノムDNAを得た。この原虫ゲノムを用いてピロプラズマ原虫を広く検出することが可能なプライマーを用いてnested PCRを行った。以前の我々の研究において北海道におけるアライグマの原虫保有率は5年前では9/348頭(2.58%)であったのに対して、今回の研究では北海道で捕獲されたアライグマは数検体し

か得られなかったが、すべて陰性であった。しかしながら、関西地域で得られたアライグマ血液44検体中10検体陽性を示し22.72%であった。さらに、PCR産物の塩基配列を決定し進化系統解析を行った(図1)。

アライグマの感染している原虫の進化系統解析を行った結果、1頭のアライグマから図1に示すとおり2つの異なる塩基配列が得られた(ピンク矢印)。これらはBabesia属で北米由来のアライグマ分離株(Type 1)と日本由来のアライグマ分離株(Type 2)にそれぞれ分離された。

考察

川瀬ら¹³⁾および陳内ら¹¹⁾は、2004年に道央圏(札幌、江別、北広島、千歳(馬追と追分)、夕張、苫小牧、穂別、鶴川)で捕獲された348頭のアライグマのピロプラズマ感染状況を調査し、B. microtiのグループに所属する原虫(バベシア、タイレリアとは別のグループ)と、バベシア

(*Babesia sensu stricto*) に属する 2 種類の原虫、合計 3 種類を検出した。陳内ら¹¹⁾ は、極めて低い感染率であるにも関わらず遺伝的な多様性を示した *B. microti* のグループの原虫は日本在来の野生動物由来、逆に *Babesia* 属のクレードに属した原虫は北米由来である可能性が高いと推定した。さらに陳内ら¹¹⁾ は、捕獲アライグマが全て 4 歳以下で、国内で繁殖した個体であることから、検出された原虫の全てが日本国内で感染した、すなわち原虫の起源は特定できないものの、これらの原虫が日本の野生アライグマを宿主として、新たな感染サイクルを確立しつつあるとの懸念を示している。

アライグマの野生化は全国で観察されており、農作物などへの被害は今も拡大傾向が続いている。アライグマのピロプラズマ症についても、道央圏で観察されたものと同じ状況が日本の各地で起きている可能性があるが、これまで調査が行われたことはない。そこで今回筆者は、野生動物の種類や分布、あるいはダニの分布において道央圏とは違いがあると考えられる関西地方を含めてアライグマのピロプラズマ原虫感染保有状況を実施した。

ピロプラズマ原虫感染保有状況を調査した結果、原虫の 18S rRNA 遺伝子を標的とした nested PCR では 10 サンプルが陽性（陽性率 22.72%）となった。外来生物のアライグマは本州と北海道に同時期に移入されていることから、外来生物であるアライグマが日本に移入される際に既にバベシア原虫に感染していたことが示唆され、アライグマの世代交代とともに原虫が日本固有媒介ダニあるいは野生動物へ適応していると考えられる。これらの部分塩基配列を決定して BLAST 検索したところ、全てがピロプラズマ感染陽性となった。陽性個体のうち 1 サンプルについてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定することが出来なかったため、大腸菌を用いたクローニングを行い 2 種類の原虫の混合感染していることが確認され、それぞれについて全塩基配列決定を行った。全長を決定できた 2 個の配列を用いて進化系統樹を作製したところ、*B. microti* のグループに属する遺伝子型と *Babesia sensu stricto* (*Babesia* 属) の中に帰属する遺伝子型の原虫であることが分かった (図 1)。

通常ピロプラズマ症は一度感染すると、治療しない限り完治は難しく、長期間にわたって少量の原虫が血流中に存在し続け、輸血感染症の原因になる³⁾。さらに原虫常在

地では、感受性動物が複数種および複数遺伝子型の原虫の感染を受けるため、寄生率が高だけでなく、混合感染の頻度も上がる傾向がある^{3,12)}。実際、アライグマの生息地の北米では、多くの個体が複数の原虫種に感染しており、トータルでのピロプラズマ原虫感染率はときに 90% を超えると報告されている^{3,19)}。

日本の野生アライグマに関しては、川渕ら¹⁵⁾ および陳内ら¹¹⁾ の道央圏での調査報告があるが、それ以外の報告はなく全体像は明らかでない。ただ、上述の報告によれば、*B. microti* のグループに属する原虫 1 種類と *Babesia sensu stricto* に属する原虫 2 種類、合計 3 種類が検出されたものの原虫の寄生率が極めて低かった。したがって、順化途中であるとしてもかなり初期の段階であると思われた。これに対して、今回の調査では北海道と関西地方の寄生率がトータルでそれぞれ 22.72% (10/44) と高値を示し、一見原虫の順化・定着が進んでいることが示唆された。以上の結果をまとめると、①外来種として全国に広まりつつあるアライグマが、地域によってはこれまで報告されていたよりも遙かに高いピロプラズマ保有率になっていることが明らかになった。②検出された原虫が米国のアライグマのものか、日本在来の野生肉食動物のものかは定かでないが、いずれにしろ原虫保有率が高ければアライグマへの順化・定着の速度が増し、その種類が増える可能性があり、いったんそれらがアライグマで大量に増殖しはじめれば、増幅 (Amplification) 効果によって、在来の野生肉食動物や家畜に飛び火感染する可能性も出てくると危惧される。今後も今回と同様の調査を継続する必要がある。

引用文献

- 1) Anderson, J.F., Magnarelli, L.A. & Sulzer, A.J. (1981) : *J. Parasitol.* 67, 417-425.
- 2) Anderson, T.J., Haubold, B., Williams, J.T. et al. (2000) : *Molecul. Biol. Evol.* 17, 1467-1482.
- 3) Arai, S., Tsuji, M., Kim, S.J. et al. (1998) : *J. Vet. Med. Sci.* 60, 1321-1327.
- 4) Balmer, O. & Caccone, A. (2008) : *Acta Tropica* 107, 275-279.
- 5) Bischof, R. & Rogers, D.G. (2005) : *J. Wildl. Dis.* 41, 787-791.
- 6) Brocklesby, D.W. (1979) : *J. South Afri. Vet. Assoc.* 50, 302-307.
- 7) Camacho, A.T., Pallas, E., Gestal, J.J. et al. (2001) : *Vet. Rec.* 149, 552-555.
- 8) Goethert, H.K., Telford, S.R. 3rd, (2003) : *Parasitol.* 127, 301-309.

- 9) Hancock,K., Thiele,L.A., Zajac,A.M. et al. (2005) : *J. Parasitol.* 91, 694-695.
- 10) Inokuma,H., Yoshizaki,Y., Shimada,Y. et al. (2003) : *J. Clin. Microbiol.* 41, 3494-3498.
- 11) Jinnai,M., Kawabuchi-Kurata,T., Tsuji,M. et al. (2009) : *Vet. Parasitol.* 162, 241-247.
- 12) Jinnai,M., Kawabuchi-Kurata,T., Tsuji,M. et al. (2010) : *Vet. Parasitol.* 173, 128-133.
- 13) Kawabuchi,T., Tsuji,M., Sado,A. et al. (2005) : *J. Vet. Med. Sci.* 67, 825-827.
- 14) Lopez-Rebollar,L.M., Penzhorn,B.L., de Waal,D.T. et al. (1999) : *J. Wildl. Dis.* 35, 82-85.
- 15) Mitchell,M.A., Hungeford,L.L., Nixon,C. et al. (1999) : *J. Wildl. Dis.* 35, 347-355.
- 16) Penzhorn,B.L. (2006) : *Vet. Parasitol.* 138, 11-21.
- 17) Penzhorn,B.L., Schoeman,T. & Jacobson,L.S. (2004) : *Ann. New York Aca. Sci.* 1026, 83-186.
- 18) Real,L.A., Russell,C., Waller,L. et al. (2005) : *J. Heredity* 96, 253-260.
- 19) Telford,S.R.,Jr. & Forrester,D.J. (1991) : *J. Wildl. Dis.* 27, 486-490.
- 20) Zahler,M., Rinder,H., Schein,E. et al. (2000) : *Vet. Parasitol.* 89, 241-248.