HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular epidemiological study of selected infectious diseases of livestock in Zambia [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	MULEYA, WALTER
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11073号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53862
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Muleya_Walter_review.pdf, 「審査の要旨」

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：Muleya Walter

審査委員	主査　教授	澤　洋文
	副査　教授	杉本　千尋
	副査　教授	石塚　真由美
	副査　教授	苅和　宏明

学位論文題名

Molecular epidemiological study of selected infectious diseases of livestock in Zambia

(ザンビアの家畜における感染症の分子疫学的調査)

感染症の研究において、分子生物学的方法は、疫学研究、基礎研究、および診断法の開発を含む応用研究で重要な方法である。分子生物学的手法は、家畜や野生動物の検体を用いた臨床応用の前に、その感度、特異度、および技術的ミスを生じさせない利便性を有することを確認することが必要である。本博士論文は、ザンビアを含むアフリカ諸国で公衆衛生学的、経済的に問題となっている感染症であるタイレリア症、および狂犬病を対象として、分子生物学的手法に着眼し実施した、疫学研究および基礎研究で得られた結果について報告した。

第 I 章では、ザンビアで採取した牛血液中に存在する *Theileria parva* （*T. parva*）原虫の DNA の存在を、PCR 法でスクリーニングした。さらに PCR 陽性の試料について、マイクロサテライトマーカーを用いた多様解析を実施し、その結果を記載した。タイレリア p104 遺伝子を対象とした PCR スクリーニングでは、両地区で平均 54.9% (78/142)の検体が陽性であり、Isoka 地区で採集した検体の陽性率は 44.8% (43/96)、Petauke 地区で採集した検体の陽性率は 76.1% (35/46)であった。*T. parva* 遺伝子陽性の 61 検体（Isoka の検体 33 例、Petauke の検体 28 例）は、原虫ゲノムの 4 つの染色体中に存在する 9 つのマイクロサテライトマーカーを用いて多様性解析を実施した。得られたマイクロサテライトマーカーの情報は、(1) Microsatellite tool kit、(2) GenAlEx ver. 6、(3) Fstat ver. 2.9.3.2、(4) LIAN の 4 つのソフトウェアを用いて解析した。その結果、Isoka と Petauke の原虫群のゲノム間の近交度は Wright の F 統計法による解析から比較的低いことが示唆された(Wright’s F index, FST = 0.178)。また、Isoka および Petauke の各群を一つの群として仮定すると、マイクロサテライトは連鎖不平衡であると示されることから、両地区の原虫は交雑度が低いことが考えられた。さらに、Isoka 内の 2 地区群、Petauke 群内でも連鎖不平衡となることが示されたことから、各地域の原虫は独立しており、地域間での原虫の遺伝子交換の頻

度が低いことが示唆された。本結果は、混合生ワクチンを用いたタイレリア原虫対策を行う際に、各地域での新しい遺伝子型の原虫の導入を防ぎ、タイレリア非汚染地域への原虫の拡散を防止するために、流行型の遺伝情報に留意すべきであることを示唆するものであり、今後のタイレリア症対策にとって重要な情報を得ることができた。

第II章では、ザンビアにおける狂犬病を対象とした研究を実施した。狂犬病はザンビアの全土にわたって発生が認められており、1901年に西部地域で狂犬病が発生し、その地域の族長であったLewanika氏が犬の駆除を命じたと伝えられている。また、ザンビアでの最初の狂犬病の診断は1913年に実施されたと報告されている。ザンビアにおいては、以前はジャッカルが狂犬病の保有動物として問題となっていたが、現在ではイヌが主要な保有動物であると報告されている。本研究では、1998年から2009年にわたって、ザンビア大学にて診断・保管されていた検体を用いて、ザンビアのイヌ、家畜、および野生動物に感染していた狂犬病ウイルス（RABV）の流行株について核タンパク質であるnucleoprotein（N）および膜タンパク質であるglycoprotein（G）の遺伝子を検索し、系統樹解析を実施した。蛍光抗体法で陽性であった87例の動物の脳組織からRNAを抽出し、nested RT-PCR法を用いて狂犬病ウイルスゲノムを確認した結果、37例で陽性所見が得られた。N遺伝子を対象とした系統樹解析（33例）では、検体はアフリカ東部および南部地域に分布するAfrica 1b lineageに属する2つのclusterに帰属しており、1つのclusterはザンビアの検体のみで構成され、もう1つのclusterはザンビアの他、タンザニア、モザンビークの検体が含まれていた。G遺伝子を対象とした、解析ではザンビアの複数の地域および、異なる動物種から検出されるRABVが同じclusterに属することが示された。さらに、得られたN遺伝子配列を基にreverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)法に用いるプライマーを設計し、上記の検体を用いて、有用性を確認した。その結果、RT-PCR法の結果と比較した場合、本RT-LAMP法は特異性と再現性を有しており、臨床検体への有効性が確認された。

本研究では、ザンビアで実際に流行している*T. parva*およびRABVの遺伝子型を明らかにした。得られた成果を基にして、研究だけでは無く、実際の臨床検体に応用可能な分子生物学的手法を開発した。以上、本研究は、分子生物学的手法を用いた診断法の開発を介して、ザンビアの家畜等の感染症対策に有用な結果を残した。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者Muleya Walter氏の学位論文は，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学位論文の審査等に合格と認めた。