



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Application of metagenomic approaches in the comprehensive detection and characterization of trypanosomes, microbiome and blood meal sources in tsetse flies [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Gaithuma, Alex Samuel Kiarie
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第13721号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/76127
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Alex_Samuel_Kiarie_GAITHUMA_review.pdf, 審査の要旨



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:Alex Samuel Kiarie GAITHUMA

審査委員	主査	准教授	山	岸	潤	也
	副査	教授	大	橋	和	彦
	副査	教授	野	中	成	晃
	副査	准教授	今	内	覚	

学位論文題名

Application of metagenomic approaches in the comprehensive detection and characterization of trypanosomes, microbiome and blood meal sources in tsetse flies

(メタゲノム的手法を用いたツェツェバエ内トリパノソーマ原虫、細菌叢、および吸血源の包括的解析)

Human African trypanosomiasis (HAT、あるいはアフリカ睡眠病) および Animal African trypanosomiasis (AAT、あるいはナガナ病) は共にサブサハラアフリカの風土病である。その病原体はトリパノソーマ属の原虫であり、ツェツェバエにより媒介される。なかでも、HAT は、*Trypanosoma brucei rhodesiense* および、*T. b. gambiense* によって引き起こされることが知られている。一方、AAT は *T. b. brucei*、*T. congolense*、*T. vivax*、*T. evansi* など多様な病原体が引き起こす。

これらの原虫を検出するにあたり、Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) を標的とした PCR が広く用いられており、増幅産物のサイズにより種の同定が可能である。さらに詳細な種内系統に関する情報を得るためには、増幅産物の塩基配列を解析する必要があるが、解析費用や多重感染が問題となるため一般的に行われているとは言い難い。ここで、本学位論文提出者である Alex Samuel Kiarie GAITHUMA 氏は、上記の増幅産物をプールし次世代シーケンサーを用いて一括解析する方法 (Amplicon-seq) を着想した。付随して、感度に優れるプライマーの再設計・評価も行い、それらを組み合わせることで、低コスト、かつ多重感染サンプルの解析を可能とし、さらに、従来法と比較して感度と特異性においても優れるトリパノソーマ原虫の検出方法の開発に成功した。本方法を用いて、ザンビアおよびジンバブエで捕集したツェツェバエ (Rufunsa, $n=200$, 種未同定 ; Kafue, $n=85$, *Glossina morsitans centralis* ; Hurungwe, $n=188$, 種未同定) におけるトリパノソーマ原虫の保有率に関する調査を実施した結果、約 30% のツェツェバエから、5 種、378 系統のトリパノソーマ原虫由来配列の検出に成功した。

次に、ツェツェバエの吸血源動物種を特定し、トリパノソーマ原虫の reservoir を推定することを目的に、哺乳動物 12S rRNA 配列の増幅と次世代シーケンサーによる Amplicon-seq 解析を実施した。鋳型には、ITS1 解析に供試したものと同一ツェツェバエ由来 DNA (Kafue, $n=85$) を用いた。その結果、ヒト由来配列を 43 検体から、black rat (*Rattus rattus*) 由来配列を 27 検体から検出した。加えて、African buffalo (*Syncerus caffer*)、common warthog (*Phacochoerus africanus*)、greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*)、straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*) などのアフリカに生息する各種野生動物、cattle (*Bos taurus*)、dog (*Canis lupus familiaris*) などの家畜に由来する配列も検出された。これまで black rat や straw-colored fruit bat は吸血源として重要視されていなかったことから、本研究により Kafue 地域のツェツェバエが想定以上に多様な動物を吸血源とすることが示唆された。

最後に、同じく Kafue のツェツェバエから精製した DNA を鋳型に、16S rRNA V3-V4 領域の多様性に基づく細菌叢解析を行った。その結果、ツェツェバエの共生細菌として知られている *Sodalis*、*Wolbachia*、*Wigglesworthia* の 3 属が過去の知見と同様に優占的に検出された。続いて多次元尺度構成法を用いて細菌叢を 2 次元にプロットし、吸血源、ハエの性別、トリパノソーマ感染の有無との相関を解析したが、現状では明らかな違いは認められなかった。

以上、本学位論文提出者は、ツェツェバエから抽出した DNA から、トリパノソーマ原虫の感染の有無、およびその系統、吸血源、細菌叢を大規模に解析する系の確立を行った。本系を用いることで同一個体から上記情報を得ることができる。従って、今後、検体数を増やし各情報間の相関を取ることで、reservoir に関する手がかり、あるいは、新たな原虫 - 細菌叢の相互作用等が見出される可能性があり、その応用は将来の疾病対策に大きく寄与するものである。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 Alex Samuel Kiarie GAITHUMA 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。