

Babesia microti の正体を探る

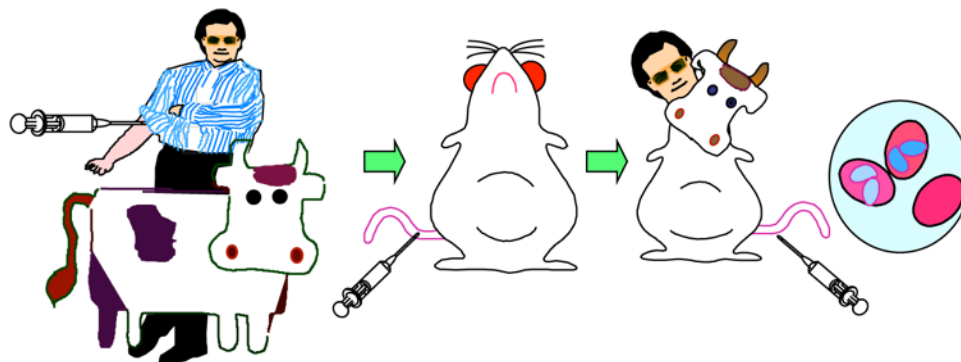
CCT7 sequence data provide an efficient method to address a large spectrum of questions, from the simple to the complex, relating to the phylogenetic relationships within the species complex *Babesia microti* including its interrelationships.

バベシア症 (ピロプラズマ症)

ピロプラズマ症は、ダニが媒介する赤血球内寄生原虫 (ピロプラズマ) の感染によってもたらされるマラリア様の疾病で、ヒトや家畜が罹患しときに致死経過をとる。ピロプラズマ原虫は、その形態や白血球ステージの有無などの違いによりバベシア (*Babesia sensu stricto*)、タイレリア (*Theileria*)、サイタックスズーン (*Cytauxzoon*) など複数グループに分類される。ヒトに感染するピロプラズマ原虫は数種以上知られるが、これまでに報告された症例のほとんどは *Babesia microti* によるもので、米国北東部沿岸域に集中している。*B. microti* の自然宿主はシカシロアシネズミ (*Peromyscus leucopus*) 等の野鼠で (ときにトガリネズミ=モグラの仲間)、マダニ (*Ixodes scapularis*) によって媒介され、ヒトはマダニに咬まれ、あるいは汚染血の輸血によって感染する。発見から 30 年余り、本症は米国北東部の地方病とされてきた。しかし 1999 年に日本で患者が発生し、これが *B. microti* 様原虫の輸血感染事故であることが明らかになった。それを確認した我々の報告が契機となって世界各地で調査研究がはじまり原虫が検出された結果、現在では *B. microti* およびその近縁原虫が北半球温帯域 (アジア大陸および北米大陸) に広く分布することが明らかになっている。

ピロプラズマ原虫の遺伝子診断には 18S リボゾーム遺伝子 (*18S rDNA*) が広くマーカーとして使用されている。しかし原虫進化史は予想外に長く、このマーカーだけで全ての進化関係を解明することは出来ない。そこで我々 (Zaomoto et al., 2004A, B) および Goethert, H.K. and Telford, S.R. III (2003) は β -*bubulin* 遺伝子を加えた 2 マーカー併用法を以前に提唱した。現在この 2 マーカー併用法は普及しつつあるが、今回はこの 2 マーカー併用法よりもさらに広い範囲の進化史を高解析精度で解明する新しい解析方法を開発したので紹介する。すなわち chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta) (*CCT7*) 遺伝子が保有する 12 個のイントロン使って、その位置パターンから *18S rDNA* で解析出来ない初期進化を解明し、コーディング配列 (CDS) は中間の進化史を、イントロンの塩基配列からごく最近の進化を解析する方法である。以下に、*CCT7* マーカーが明らかにした *B. microti* 原虫の進化史を示す。

Key word: *Babesia microti*、バベシア、ピロプラズマ、原虫、ダニ媒介性、人獣共通感染症、進化



酪農学園大学

教授 石原智明

はじめに

(1) ピロプラズマ原虫の分類学的位置づけと主な特徴

ピロプラズマ (order Piropasmida) はアピコンプレックス門に所属する原虫 (単細胞真核生物) である。この門は全てが偏性寄生性単細胞生物からなり、現在約 6000 種が記載されている。しかし、さらにその 100-1000 倍の種 (species) が今もなお未発見のまま残されていると推測されている。アピコンプレックス門に所属する代表的な病原体として、ピロプラズマ (*Babesia*、*Theileria* など)、ヘモスポリディア (*Plasmodium*、*Leucocytozoon* など)、コクシディア (*Eimeria*、*Isospora*、*Cyclospora*、*Toxoplasma*、*Sarcocystis*、*Frenkellia*、*Hepatozoon* や *Adelina* など)、クリプトスポリディア (*Cryptosporidium*)、グレガ

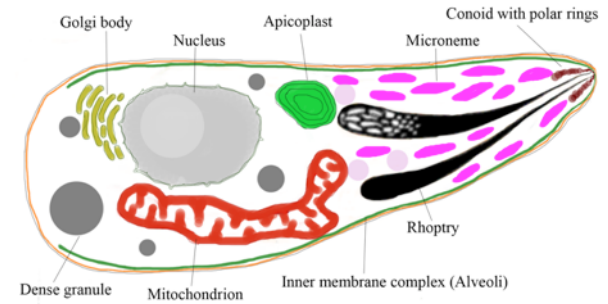


Fig. 1. Schematic drawing of a typical Apicomplexa

リアなどがある。 (<http://tolweb.org/Apicomplexa>) アピコンプレックスの名前はラテン語の Apex (top) と Complexus (infolds) に由来し、スポロゾイトが宿主細胞に進入する際に働く一連の諸器官 (Apical complex = microneme、rhoptry、polar ring、conoid) を有する原虫という意味である。(図1) また、この門に属する多くの原虫種は1個のミトコンドリア、1個のアピコプラスト (光合成能を失った紅藻由来の二次共生体) を保有する。しかしそれらゲノムの大半は既に失われ、一部は核移行して小器官内にはごく僅かの断片が残るのみである。(詳細は <http://apiloc.biochem.unimelb.edu.au/apiloc/apiloc> 参照)

ピロプラズマの出現時期は、形態や分子進化データから 5.5 から 6 億年前と推定されている。(Fig. 2; Nguyen et al., 2007; Kuo & Kissinger 2008; Roy & Penny, 2006; Perkins & Schall, 2002) しかし、哺乳類宿主との共進化関係をベースにした試算もあり、その場合のピロプラズマ進化史は前者の約 1/10 である。(Criado-Fornelio et al., 2003) 多細胞生物に近い速度で進化して来たのか、あるいは短い世代時間と大きな集団規模の故に非常に速い速度で進化して来たのか、化石情報がほとんど残されていないので、原虫類の進化時間を特定することは容易ではない。注1)

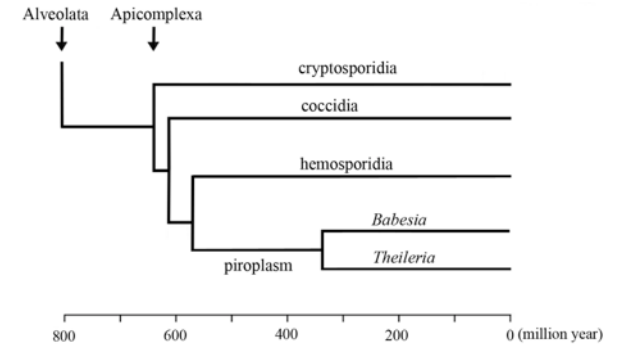


Fig. 2. Molecular evolution of apicomplexan lineages
After Nguyen et al., 2007.

(2) ピロプラズマ原虫の種類、生活環および各種生物性状

Allsop & Allsop (2007) の記載に従えば、ピロプラズマ目には *Babesia* (sensu stricto) 属、*Theileria* 属のほか、Group A (*Cytauxzoon* とその仲間)、Group B (*Babesia duncanni* とその仲間)、Group C (*Babesia microti* とその仲間) などがあり、200種以上の種名が知ら

注1): 短命で代謝活性の高い生物、例えば単細胞真核生物などは、高等生物に比べてDNA複製時のエラーが多くなり、結果として進化速度が速くなるという予測がある。しかしこの推定には疑問がある。増殖中の集団は一定頻度で遺伝子変異を生み、それを集団内に random genetic drifts として蓄える。(莫大な数の遺伝子変異はその大半が中立変異で、やがて新しく出現する中立変異に置き換えられ、集団から捨て去られる運命にある - "中立説") しかし、もし大きな環境変化が発生したとき、それまでは使い道が無い中立変異として集団内に蓄えられていた多数の遺伝子変異の中に、ごく僅かではあるが絶滅的な環境から救い出してくれる "救世主的な遺伝子変異" が含まれることがある。(例えば、エイズウイルスの出現とエイズ抵抗性遺伝子の様な関係) その場合、救世主的な変異は優性遺伝子としてはたらし (他は死亡するため)、有性生殖 (染色体交換) を介して集団内に急速に拡まるはずである。(遺伝的多様性の方法として有性生殖による染色体交換を説明することがあるが、実際のところは、災害発生時に、普段から備蓄していた人道支援物資の中から必要な物資を選んで、迅速・効率的にできるだけ多くの仲間に配布する手段と定義する方が的を得ているのではあるまいか?) 地球史のなかで、種の絶滅をもたらすほどの大きな環境変化が、もしも高等生物に対しても単細胞真核生物に対しても同頻度でおこって来たとして、進化率 (the evolutionary rates = the rates of selection and fixation of mutations) は互いに近似すると考えられる。既知種の 100倍~100倍の未発見種が実在すると推定される単細胞真核生物が将来発見され、ゲノムが解読され、進化史の解明が進めば、この仮説が正しいか否か明らかになることだろう。

れる。ヒトに感染し発病させる原虫としては、これまでに7つのグループ (phylogenetic taxa) 注2) が知られている。その多くは *B. microti* とその関連原虫 (Allsop & Allsop 2007による Group C) によるものである。*Babesia sensu stricto* グループの感染として、少数の *B. divergens* 感染症例とごく希なケースとして (多くは1例報告) *B. bovis*, *B. canis*, *B. venatorum* (別名 *Babesia* EU1) やヒツジの *B. ovis* に近縁の *Babesia* sp. (KO1) の報告がある。またこれ以外にも *B. duncani* (Allsop & Allsop, 2007 の分類による Group B) の患者報告も見られる。ピロプラズマには相当数の未発見種があると推定されるので、その中にさらにヒトに感染する種類が含まれる可能性は大きい。一方、最近の分子・遺伝子診断技術の普及により、以前は非常に厳格とされていた宿種特異性がさほどでなく、容易に他の宿種にも感染することが明らかになってきている。{Hunfeld et al., 2008 (総説); <http://en.wikipedia.org/wiki/Babesia> 参照} 従って、その意味でもヒトに感染性を示すピロプラズマ原虫の種類が今後さらに増加する可能性も考えられる。

ピロプラズマ原虫の生活環は3つのステージからなる。有性生殖ステージ(ガメトゴニー)はダニの体内で営まれ、配偶子 (ガメート) を形成、さらに2つの配偶子の接合がおこる。その後はダニの唾液腺に入り、スポロゴニー (無性生殖による孢子形成ステージ) を営む。ダニが哺乳類宿主を咬むと、孢子虫 (sporozoite)が体内に送り込まれ、メロゴニー (またはシゾゴニー) へと進む。すなわちスポロゾイトとして送り込まれた原虫は、あるものは直接赤血球に感染し (*Babesia sensu stricto*)、またあるものは一旦リンパ球 (*Theileria*)や単球 (*Cytauxzoon*)で増殖した後に、赤血球ステージに進む。(Fig. 3) 各ステージの原虫 DNA 量を測定した報告によればスポロゾイトは haploid (単相) で、ザイゴートとキネートは diploid (複相) だという。(Mackernstedt et al., 1990) 従ってピロプラズマも、*Plasmodium* と同様にスポロゴニーの途中で減数分裂するとみられる。実質的な染色体交換 (Outcrossing / Xenogamy) を行うには 注3)、2種類の単相ガメートが1匹のダニの体内に同時的存在する、あるいは、幼ダニ期に取り込んだ原虫を若ダニ期まで持ち越して別の遺伝子型の供給を待つ以外にはない。成ダニの吸血で宿主に取り込まれた原虫は、介卵伝達する種類 (*Babesia sensu stricto*) 以外には次の感染機会が無く、通常は原虫のライフサイクルを維持出来ない。また、他の単細胞真核生物の多くがそうであるように、ピロプラズマ原虫も自家受精 (selfing / bi-parental inbreeding) すると考えられる。その場合は、遺伝的に同一のクローンが2個接合することになり、実質的な染色体交換はおこらない。

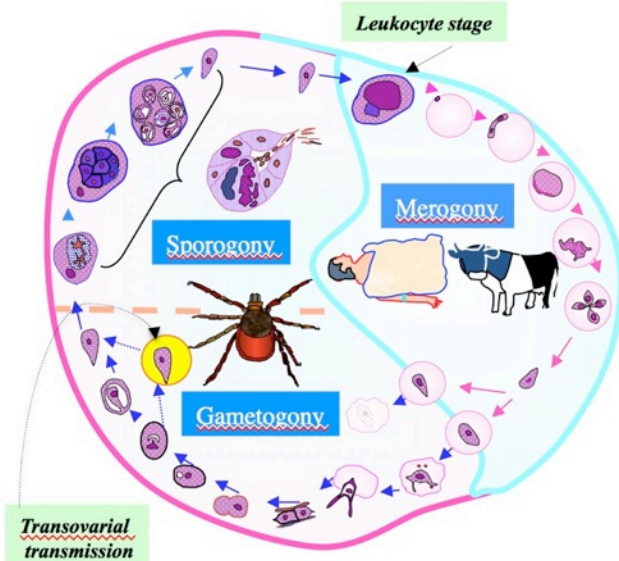


Fig. 3. Schematic Life cycle of Piroplasmida

これ以外に、単為生殖 (tychoparthenogenesis) の可能性も考えられよう。一般的には、2相性 (2n)の単為生殖だが、ほかにも単相性 (n) や、さらに 3n や 4n の単為生殖の可能性もあるかも知れない。また原虫は環境変化やその他の変化に適応する能力が高く、様々な生殖スタイルを様々な頻度で行う可能性があり {Hunfeld et al., 2008 (総説); Hunfeld et al., 2009 (総説)}、生殖方法やその頻度を必要に応じて使い分けている可能性もあろう。

注2): 有性生殖によって生殖集団内にある様々な遺伝子がシャッフルされる結果、ピロプラズマ原虫の生殖集団は病原性や宿種感受性などの遺伝性状を共有していると考えられる。原虫の集団構成について、この20年余り“clonality / sexuality 論議”があった。しかし、原虫の増殖がほとんどクローナルであるとする説はいまや過去のものとなり、様々な核単細胞真核生物が、自家受精や単為生殖はするものの、高い頻度で染色体交換を行っていることが明らかになってきた。{Tibayrenc 2003(総説)}

注3): おもに形態学的な知見からピロプラズマ原虫はサイズの異なる2種類のガメートを産生する (heterogamy/anisogamy) とされる。しかし、精子型 / 卵子型生殖細胞の出現に関する進化のメカニズムはほとんど判っていない。性の出現と進化については、異なる多数の仮説があり統一見解はない。それゆえ、性の進化メカニズムが解明され、進化史の上での精子型 / 卵子型細胞の由来や進化の経路などが明確になるまでは、hetero- / iso-gamy の用語の使用を慎重すべきだろう。

(3) ピロプラズマ原虫の混合感染と持続感染

マラリア原虫やピロプラズマ原虫の様な寄生性単細胞真核生物は、一般に複数遺伝子型の混合・長期持続感染^{注4)}の様式をとる。(図4は日本の第1号バベシア患者と、感染の原因となった血液ドナーの感染経過だが、いずれも1年以上の長期にわたって感染が持続していた。) とくに常在地では混合・長期持続感染の割合が高い。(Anderson et al., 2000; Jinnai et al., 2010) 原虫が有性生殖により染色体交換を(outcrossing) 行うためには吸血ダニに複数の遺伝子型原虫が取り込まれる必要があり、それを可能にするための複数遺伝子型の混合・長期持続感染かも知れない。ただこれを詳細にみると、単位面積あたりの生息数が少なく長寿命の大型野生動物は(重複感染の機会が多い) 1個体が複数の遺伝子型を保有する例が多く、単位面積あたりの密度が高く短寿命の野ネズミ

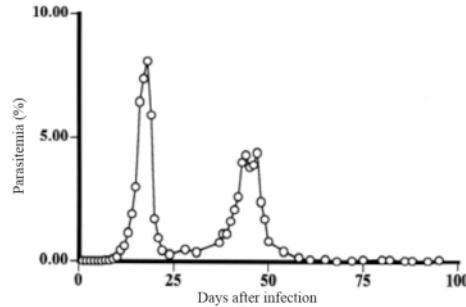


Fig. 5. Cyclical growth of a *T. orientalis* clone in a calf

Parasite was cloned by picking a single parasitized-RBC up under a microscopy from the blood of a grazing cow, which harbored C- and I- but not B-types of *T. orientalis* (also called *T. sergenti*) as determined by RFLP test on their p35 MPSP gene, and multiplied in a RBC-substituted SCID mouse. The resulting I-type clone was injected intravenously into a parasite-free splenectomized calf at a dose of 10^{10} parasitized RBCs. Peripheral blood smears were examined periodically under a microscopy for the growth of parasite. Blood samples collected at around the first and second peaks were pooled separately and genotyped using the major piroplasm surface protein (MPSP) gene. The RFLP patterns yielded from the two sample pools were identical, indicating that *T. orientalis* clone grew cyclically without any sign of MPSP gene change in an immunologically intact, but splenectomized, calf.

*4): 高等生物の器官形成では細胞の分化がおこる。かつては、細胞がいったん分化の行程にはいると、もはやもとの状態に戻ることができないと考えられていた。しかし、現在ではエピジェネティックな制御という分子機構が見つかっており、いったん分化した細胞も未分化状態に戻ることがわかっている。ただその頻度は低く、完璧な未分化状態というわけではない。{ Kadereit & Hines, 2005 (総説)} それ故、真核生物は "Stem cell" を不活性状態のまま温存し、そこから生殖母細胞をつくって自己複製する方法を採ると考えられる。これに対し体細胞は、たいてい "programed DNA rearrangement" を伴う過程を経て細胞分化する。一方単細胞真核生物では、これまでのところ高等生物の様に体細胞と生殖細胞を分ける考え方はない。しかしそれを示唆する現象も幾つかある。織毛虫類に所属する *Tetrahymena* や *Paramecium* には大小2種類の核を保有し、それらがあたかも Stem cell と Differentiated cell の様に振る舞う。小核は遺伝子の転写を行わず、有性生殖のためだけに使われる。一方、大核は DNA rearrangement を行ないそれから転写するが、この核は一代限りの使い捨てとなる。アピコンプレックス原虫には2種類の核も、Stem cell 様細胞も知られていない。しかし、マラリア原虫の一部には "hypnozoite" (休眠型原虫) が存在する。これが持続感染の根源で、活性化が時折おこることマラリア症は再発するという。(Cogswell, 2000) *T. orientalis* には間歇的な原虫血症(増殖)がおこることが知られている。通常この現象のメカニズムは宿主免疫の成立とエスケープクローンの出現で説明されるが、我々が *T. orientalis* をクローン化し、それをウシに感染させたところ、約1ヶ月サイクルの間歇的な増殖が認められた(図5) *T. orientalis* クローンに抗原変異は認められず、高力価抗体の存在下でも原虫クローンは増殖した。これらの結果から、*T. orientalis* の間歇的な増殖のメカニズムとして hypnozoite 様原虫をイメージする方がよりの確な説明かも知れない。

ここに示した断片的な事象から結論を得ることは、当然出来ない。しかし単細胞真核生物の中には、高等生物と同じ様に少数の "Stem cell" 様細胞を保持し、それが分裂して1個の娘細胞(これは休眠する)と1個の分化細胞の"もとだね"をつくり、後者が対数増殖して機能的に分化した細胞をつくる(この多くは使い捨て)ものがけっこのうであるのではあるまいか。

Sample source and date (yr-mo-day)	Detection of parasites			Reciprocal IFA titers	
	Microscopy ^a	PCR ^b	Inoculation ^c	IgM	IgG
Patient					
1998-12-28 ^d	ND ^e	-	ND	<100	<100
1999-05-24	+	+	+	12,800	1,600
1999-06-25	-	+	ND	12,800	800
1999-07-27	-	+	+	3,200	1,600
1999-08-31	+	+	+	12,800	102,400
1999-10-02	-	+	ND	12,800	51,200
1999-11-01	ND	-	ND	1,600	25,600
1999-11-29	ND	-	ND	800	25,600
1999-12-27	ND	-	ND	400	6,400
2000-01-29	ND	ND	ND	200	3,200
2000-03-08	ND	-	ND	200	3,200
2000-05-22	-	-	-	200	1,600
2000-07-19	-	-	-	100	800
Donor					
1998-12-22	ND	+	ND	200	25,600
1999-06-26	ND	-	ND	100	25,600
1999-07-27	-	-	+	50	25,600
1999-08-31	-	+	+	25	12,800
1999-10-02	-	+	+	50	25,600
1999-11-11	-	-	+	200	51,200
1999-12-20	-	-	-	100	51,200
2000-01-31	-	-	+	50	25,600
2000-03-06	-	-	+	100	25,600
2000-04-24	ND	+	ND	ND	ND

Fig. 4. Persistent infection of *B. microti* (Kobe-lineage) in a patient and a blood donor. After Wei et al., 2001.

^aThin-smear blood films were microscopically observed; +, parasitemia detectable; -, not detectable. ^bAmplification by nested PCR; +, amplification positive; -, negative. ^cInoculation into splenectomized hamster; +, parasitemia detected; -, not detected. ^dBecause a blood sample from the patient was not available on this day, the results were estimated with extracts from the cross-match test papers made prior to blood transfusion. ^eND, not done.

などは、個体レベルでは必ずしも複数遺伝子型の混合感染ではないことが多い様である。しかし後者の場合も、集団としては複数遺伝子型の混合感染であるため、幼ダ二期に取り込んだ原虫が次のステージまで持ち越され、若ダ二期の吸血で別の個体から取り込んだ別の遺伝子型原虫との間で染色体交換が成立するのだろう。(ダニが吸血途中で宿種を変えることは少ない)

進化解析とDNAマーカー

現在、ピロプラズマ原虫類の進化系統関係はおもに *18S ribosomal RNA* 遺伝子 (*18S rDNA*) の塩基配列に基づいて決められている。しかしこのマーカー単独では、非常に深いレベル (古い) の進化関係も、非常に浅いレベル (近縁) の進化関係も正確には解析できない。*18S rDNA* を補完する新しい DNA マーカーの開発は必須で急務である。ここでは、ピロプラズマの古い進化関係を解析する新しいマーカーとして *CCT7* 遺伝子の “Intron-Exon Pattern” が有用であることを述べる。加えて、*CCT7* 遺伝子の coding sequences (CDS) と intron sequences が近縁の進化関係の解析に優れていることを示す。

(1)イントロンの位置パターンに基づく進化系統関係解析

幾つかのハウスキーピング遺伝子を用いて、*B. microti* とその関連原虫 (Allsop & Allsop's の group C) の intron exon 構造をみた。*18S rDNA*、 β -tubulin、70 kDa-dulton (kd) *heat shock protein-encoding (hsp70)*、78 kd *glucose-regulated protein (grp78)* および *CCT7* の 5 遺伝子を比較したところ、遺伝子あたりのイントロン個数は、それぞれ 0、2、0、12、5 で、*CCT7* 遺伝子のイントロン保有数が最も多く、マーカーとして有用性が高い (解析感度が高い) ことが判った。そこで、*B. microti* とその関連原虫 22 株を用いて *CCT7* 遺伝子のイントロン-エクソンの位置マトリックスを作成した。(図6) 全てのイントロンは通常イントロンにみられる 5'-GT...AG-3' の挿入部位配列を有し、コーディングシークエンスには 2 個の ATP 結合モチーフがあり、イントロン-エクソン結合部位のサイズ差はなく、容易にアライメント出来た。さらに *CCT7* 遺伝子は *B. microti* のゲノム中に single-copy 遺伝子として存在することも以前に報告されている。(Nishisaka et al., 2001) 驚くべ

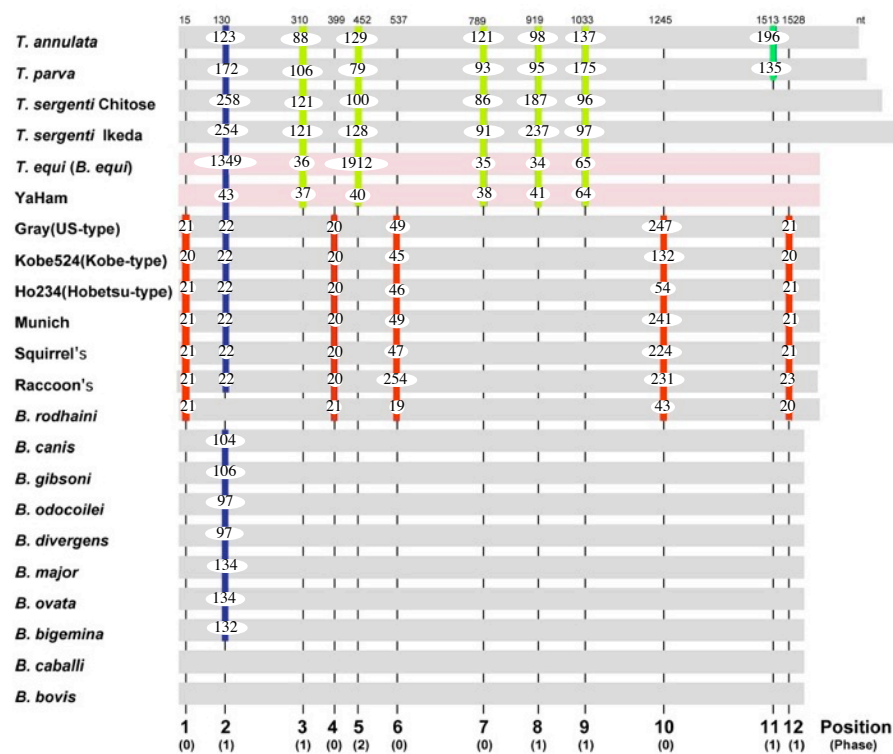


Fig. 6. Presence-absence matrix of introns within the *CCT7* gene of various piroplasma strains. After Nakajima et al., 2009; Fujisawa et al., 2011.

Tenuous transversal bar (gray or pink) shows *CCT7* gene and its nucleotide length (nt). Numerals on the mediastinum bars correspond to the size (nt) of intron: red, *B. microti*-group specific; yellow-green, *Theileria* specific; navy-blue, exist commonly in piroplasms. *T. equi* and YaHam strain, involving very deep branches in the phylogenetic trees based both on the genes, *18S rRNA*, *b-tubulin* and *CCT7*, are assembled clearly into genus *Theileria*. Very short, 19-23nt length, introns are exceptionally seen among *B. microti* and its relatives (Gray, Kobe524, Ho234, Munich, Squirrel, Raccoon and *B. rodhaini*).

きことに、CCT7 遺伝子のイントロン位置保存性は極めて高く、*Babesia sensu stricto*、*Theileria* および *B. microti* とその関連原虫 (Allsop & Allsop の group C; 図 6 の Gray 株から *B. rodhaini* まで) の 3 グループは、非常にきれいに分かれた。すなわち、第 2 イントロンは 3 群に共通だが (*B. rodhaini*、*B. caballi*、*B. bovis* は欠損)、それ以外の第 3、5、7、8、9、11 イントロンは (*T. sergenti*、*T(B.) equi*、YaHam は欠損) *Theileria* に特異で、残りの第 1、4、6、10、12 イントロンは *B. microti* とその関連原虫に特異的であることが明らかとなった。特に *Babesia sensu stricto* に所属させるか *Theileria* にするか、長年にわたって議論が行われて来た *T(B.) equi* (YaHam も系統樹解析では *T. equi* と同根) が *Theileria* グループであることが、この解析法では一目瞭然だった。 *grp78* 遺伝子はイントロンの数が半数と少なく解析精度は落ちるが、傾向は CCT7 の場合と同じだった。(Dr. Nakajima, R., personal communication) 僅かな遺伝子からゲノム構造を正確に推測できるわけではない。しかし、2 個の遺伝子の intron-exon 位置パターンが *Babesia sensu stricto*、*Theileria* および *B. microti* とその関連原虫で大きく違ったことは、この特性がゲノム構造の違いを反映していると推定出来るのではないだろうか。注5)

(2) 極小イントロン

これまでに 25nt 以下の小さなイントロンが見つかった生物種は僅かしかなく、*B. microti* とその関連原虫以外には 3 種が知られるのみである。{*Paramecium tetraurelia* (20 - 33 nt; in macronuclear genome, Russel et al., 1994)、*Bigelowiella natans* (18–21 nt; in nuclear morph genome, Gilson et al., 2006 および *Nyctotherus ovalis* (21–29 nt; macronuclear genome, Richard et al., 2008)}。この極小イントロンは、*B. microti* とその関連原虫の全てに見られ、位置も決まっているようだった。(図 6、7) 我々は以前に、*β-tubulin* 遺伝子中の 2 個のイントロンも 19-23 nt サイズであることを報告しており (Zamoto et al., 2004A)、さらに *grp78* 遺伝子でも 4 個中 3 個 (第 4 イントロンをく) が極小イントロンであった。(Dr. Nakamima, R., personal communication) これらから、極小イントロンもゲノム全体に係わる特性と推定出来る。注5) これから、イントロンの位置保存性、極小イントロンの 2 つの特性は 18S *rDNA* でも解析が困難なピロプラズマ原虫の初期進化を明らかにするマーカーと考えられた。注6)

*5): *B. microti* のゲノムが 2012 年 7 月に公表された。(Colliot, E., et al., 2012) その結果、*B. microti* と *B. bovis* (*Babesia sensu stricto*)、*T. parva* と *T. annulata* (*Theileria*) の 3 者は互いにゲノム構造が違うことが明らかになった。

*6): 最も新しく進化したと思われる U.S. 系列 (*B. microti* 近縁原虫の中での小画分でさらに 3 つの地理的亜系列 = 北米、東アジア、ヨーロッパ・中央アジア = に分けできる) の 9 株相互で、全てのイントロンの塩基配列をアライメントしたところ、DNA の置換変異は第 1、2、4、6、10、12 イントロンがそれぞれ 1、3、1、3、22、1 回、Kobe 系列はそれぞれ 1、1、1、3、1 回となり、100 nt 当たりの置換率 (%) は 4.8 から 13.6 であった。Munich 系列と Hobetsu 系列は全体で 0 および 1 回だった。一方、挿入/欠失変異は、極小イントロンには皆無で、通常サイズの第 6、10 イントロンにだけに、それぞれ 2.0 ~ 2.4 % の頻度で認められた。比較に用いた株の中には長い進化歴史をもつものも含まれる (図 8) ため、挿入/欠失変異が全くなかったことは奇異である。挿入/欠失変異が無いことは極小イントロンが進化の初期段階で現われ、注5) その後サイズを変えなかった、すなわちイントロンが極小であることに意義がある (原虫の生存に欠かせない何らかの役割がある) ことを示しているのではあるまいか。イントロンの位置パターンと極小イントロンの 2 つの特性は 18S *rDNA* でも解析が困難なピロプラズマ原虫の初期を明らかにすることが判った。繰り返すが、これらはゲノムの違いに通ずる (ゲノム解析で実際に証明された注5) 特性とみられる。すなわち、*Babesia sensu stricto*、*Theileria* および *B. microti* とその関連原虫の違いは分類上のかなり上位のランク (門や綱?) の問題である可能性があり、その意味では、ピロプラズマ以外の他のアピコンプレックス原虫にも波及すると問題かも知れない。

Parasite Strains	Gene size (ORF)	Intron position											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>B. microti</i> -group and their relatives													
U.S.													
North America													
Gray (U.S.A)	2009(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	247	-	21
G1 (U.S.A.)	2009(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	247	-	21
East Asia													
NM69 (Hokkaido)	2010(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	248	-	21
AK2273 (Hokkaido)	2010(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	248	-	21
Vladivostok38 (USSR)	2010(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	248	-	21
Irkutsk16(USSR)	2010(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	248	-	21
Korea8 (Korea)	2010(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	248	-	21
Europe to Central Asia													
Xingjiang1637 (China)	2009(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	247	-	21
HK (Germany)	2008(1629)	21	22	-	20	-	48	-	-	-	247	-	21
Munich													
Munich (Germany)	2003(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	241	-	21
Poland5 (Poland)	2003(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	241	-	21
Poland6 (Poland)	2003(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	241	-	21
UK5 (England)	2003(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	241	-	21
UK6 (England)	2003(1629)	21	22	-	20	-	49	-	-	-	241	-	21
Kobe													
Ko524 (Kobe)	1888(1629)	20	22	-	20	-	45	-	-	-	132	-	21
Hatahiyodori (Shimane)	1888(1629)	21	22	-	20	-	45	-	-	-	132	-	21
Mikura (Tokyo)	1916(1629)	20	22	-	20	-	72*	-	-	-	133	-	21
Hobetsu													
Ho234 (Hokkaido)	1813(1629)	21	22	-	20	-	46	-	-	-	54	-	21
Akkeshi (Hokkaido)	1813(1629)	21	22	-	20	-	46	-	-	-	54	-	21
Takanosu (Akita)	1813(1629)	21	22	-	20	-	46	-	-	-	54	-	21
Oti (Chiba)	1813(1629)	21	22	-	20	-	46	-	-	-	54	-	21
Awaji (Hyogo)	1813(1629)	21	22	-	20	-	46	-	-	-	54	-	21
Tsukiyo (Tokushima)	1813(1629)	21	22	-	20	-	46	-	-	-	54	-	21
Da116 (Shimane)	1813(1629)	21	22	-	20	-	46	-	-	-	54	-	21
Squirrel's													
Raccoon's	2199(1629)	20	22	-	20	-	253	-	-	-	231	-	23
<i>B. rodhaini</i>	1752(1629)	20	-	-	21	-	19	-	-	-	43	-	20

Fig. 7. Size distribution of CCT7 introns. After Nakajima et al., 2009; Fujisawa et al., 2011.

CCT7 intron size (nt) by location is shown. Twenty-four strains of *B. microti*-group (9, 5, 3 and 7 strains of U.S.-, Munich, -Kobe- and Hobetsu lineage, respectively) and 3 other relatives (squirrel's, raccoon's and *B. rodhaini*) are included. More details are noted in Fig. 5 legend.

(3) イントロンのサイズ保存性

これまででは、イントロンサイズは原虫の種類や遺伝子によりバラバラであると思われていた。(図6)しかし *CCT7* 遺伝子のイントロンを詳細に比較すると、そのサイズ保存性が極めて高いことが判った。サイズ変動幅が大きい第6および10イントロンでさえ、原虫系列あるいは亜系列ごとにサイズは1 nt 以内の幅で固定されていることが判った。(図7) これから、原虫の系列あるいは亜系列の中ではイントロン塩基配列であっても正確にアライメントできることが判った。イントロンのサイズ一致性を指標に原虫の系列あるいは亜系列の仕分けし、この仕分けの妥当性を、保存性の非常に高い *CCT7* アミノ酸配列を使った進化系統解析でさらに検証することで、アライメントに用いる原虫株の範囲を厳格に定めることが出来る。イントロンにはCDSの様な配列の拘束性がなく変異が蓄積し易い性質があり、高解析精度進化マーカーとなるものが多いが、その一方でアライメントが難しいという欠点がある。とくに原虫類では未発見種の数が既存種の100-1000倍とも言われており、進化系統関係を比較する範囲を適切に定め、十分な原虫サンプルの密度を確

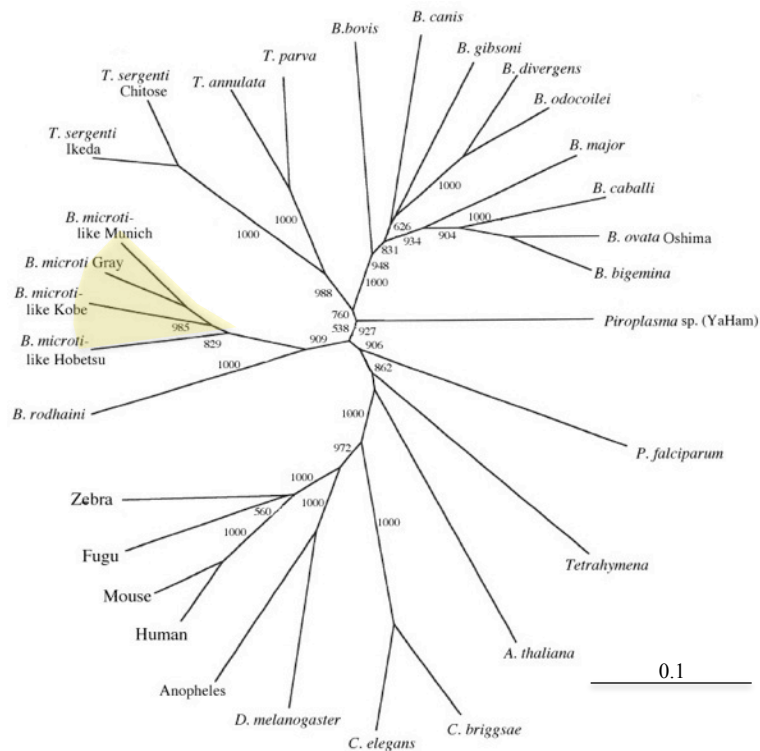
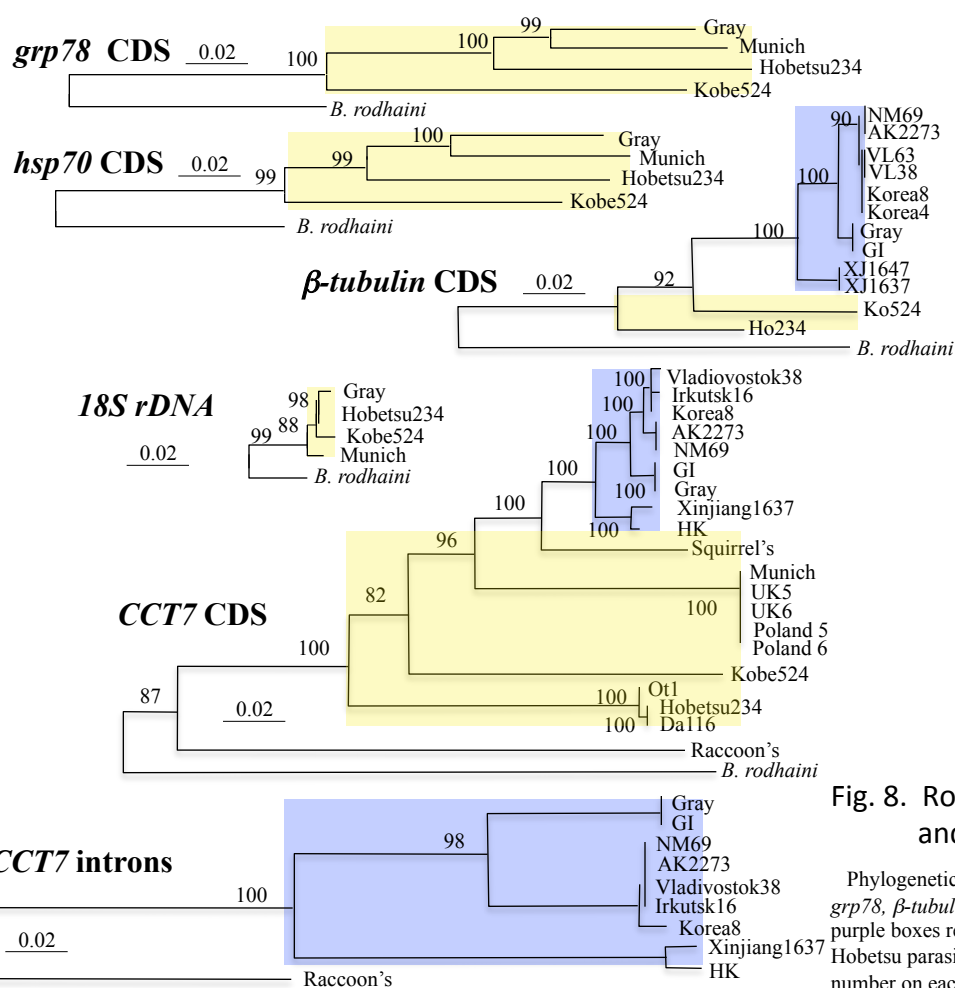


Fig. 8. Rooted and unrooted phylogenetic trees based on *CCT7* gene and 5 other gene regions of *B. microti* and its relatives

Phylogenetic trees constructed by the neighbor-joining method with the coding sequences of *18S rDNA*, *hsp70*, *grp78*, *β-tubulin* and *CCT7* genes and as well as with the combined sequences of the 6 *CCT7* introns. Yellow and purple boxes represent, respectively, the evolutionary distance among the 4 lineages of the U.S., Munich, Kobe and Hobetsu parasites and among the 9 strains in the U.S. lineage. Scale shows evolutionary distance in percent. The number on each node shows the percent occurrence in 1000 bootstrap replicates.

保することは容易でない。進化速度の速い非コーディング配列をマーカー（例えば *internally transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA*^{注8)} など）に使用するとき、サンプル数の不足やサンプル密度の偏りに伴う PBA (problem of long branch attraction)^{注7)} が発生し易いので注意を要する。

(3) 近縁原虫種間の進化関係を解析するDNAマーカー

ピロプラズマの5個のハウスキーピング遺伝子 (*18S rDNA*, *hsp70*, *grp78*, β -*tubulin* および *CCT7*) の CDS と 6 個の *CCT7* イントロンの塩基配列を用いて、近縁原虫相互の進化関係の解析を行った。(図8) 5 個の遺伝子の CDS に基づく進化系統樹は、*B. microti* とその関連原虫 (*B. rodhaini* を含む) が 1 つの共通祖先に由来する集団で、*Theileria* や *Babesia sensu stricto* とは別グループであることを示した。(Zamoto et al., 2004A, Nakajima et al., 2009, Jinnai et al., 2009) イントロン配列は *B. microti* グループの内部系列あるいは亜系列の中できれいにアライメントでき、系列を越えてアライメントはサイズ差が大きく出来なかった。(図7) *CCT7* イントロン (6 個の結合配列) の解析感度を知るため、U.S. 系列内の Gray と Xinjiang 株間の配列差を比較した。イントロンは、2 株間に 7.6 % の配列差 (383 塩基中 29 箇所の違い --- 23 塩基置換と 6 個の挿入/欠失変異) があり、*18S rDNA* の 63 倍 (0.12% --- 1665 nt 中 2 塩基の変異)、*CCT7* CDS の 2.6 倍 (2.9% --- 1629 nt 中 47 塩基の差) の変異率だった。(Fujisawa et al., 2011) これから、イントロン配列はごく最近 (近縁原虫相互) の進化関係を解析する有力なマーカーとなることが判った。ミトコンドリア遺伝子 (*mitDNA*) も高等生物の近縁種間の解析に汎用されているマーカーである。しかし、アピコンプレックスのミトコンドリアゲノムは 7 キロベース以下と短く、*cox1*, *cox3*, *cob* の 3 遺伝子しかコードしていない (Brayton et al 2007, Kairo et al 1994, Gray et al 1998)、非常に安定で進化速度が *18S rDNA* に近い (Criado et al., 2006) ため近縁原虫の進化解析マーカーにならない。

集団の遺伝子構造

Complex species である *B. microti* とその近縁原虫は、各種の野鼠やモグラの仲間を宿主とし、*Ixodes* 属のマダニをベクターとして、北半球温帯域に広く分布している。本群はヒト患者数が最も多い。研究の歴史は長い、本群の地理的変異の問題や集団の遺伝子構造が調べられたことはほとんどない。遺伝的多様性の解明なしに、公衆衛生対策は出来ないし、的確に診断し治療することも出来ない。それ故我々は、*CCT7* CDS と *CCT7* イントロンをマーカーとして、世界各地から収集した *B. microti* とその関連原虫 24 株の詳しい進化系統関係の解析を行うことにした。(Nakajima et al., 2009; Fujisawa et al., 2011)

注7) PBA (problem of long branch attraction) アーティファクトは、大きな配列差のある 2 つのシークエンスを一つにまとめてアライメント、比較解析する場合におこりやすい。このエラーは、進化速度が速い DNA マーカーを用いる解析の際に (より高い密度のサンプルが必要) 十分な数のサンプルを用意出来なかった場合、あるいは比較するサンプルの中にユニークな変異をたくさん持つものが混在する場合、などにおこりやすい。[Baldauf, 2003 (総説)] 正確にアライメント出来ないことが原因となって、間違った進化系統関係が算定される。サンプル密度が十分で無い場合、アライメント精度を確保することは予想以上に難しい。変異は全ての位置に均等におこるわけではなく (拘束性がある)、変位可能な部位はある程度限られているため、いつかは飽和するはずである (高感度 DNA マーカーではより速く)。しかし、変異自体は時間に伴って一定頻度で発生し続けるので、同じ場所に 2 巡目 3 巡目の変位が重ね書きされることになる。すなわち、見かけ上の A と C の違いの中に 1 巡目の (A → C) と 2 巡目の (A → G → C / A → T → C) の両者が混在する可能性が出現する。サンプル密度が高ければ 1 巡目か 2 巡目かの違いを読み取ることは容易だが、未発見種の多いピロプラズマ原虫類の場合、そもそもサンプル密度の確保に限界があるため、PBA に対して特に注意しておく必要がある。

Fig. 8 の *CCT7* intron tree と *CCT7* CDS tree の青紫で囲われた集団 (U.S. 3 亜系) の内部進化距離を 1 とした場合、Raccoon 原虫の進化距離は intron および CDS 配列をマーカーにしたとき、それぞれおよそ 0.9 と 7.9 倍である。同様に *CCT7* CDS tree と *18S rDNA* tree の黄色で囲われた集団の進化距離 (*B. microti* 4 系列) を *B. rodhaini* のそれと比較すると、前者はおよそ 1.5 倍、後者は 2.2 倍である。進化距離 (塩基配列差に近似) メモリは等倍でなく、根元が狭く枝端で広がる対数になるのだろう。

注8) *rDNA* CDS の配列保存性は非常に高いが、ITS 領域には多数の置換変異や挿入/欠失変異が認められる。そのため ITS 領域を用いて、ヒトとカエルのような遠い進化関係の解析を行うべきではないと言われる。にも関わらず、ピロプラズマ研究領域ではヒトとカエルよりも遙かに遠い (配列差の大きい) 原虫サンプルの ITS 配列比較が行われていることがある。よく知られているピロプラズマ原虫相互の進化距離 (塩基配列の差異) は一般に想像されている以上に遠い。参考のため、動物界、植物界、菌界を加えたピロプラズマ原虫の進化系統樹 (*CCT7* CDS unrooted tree) を Fig. 8 に示す。

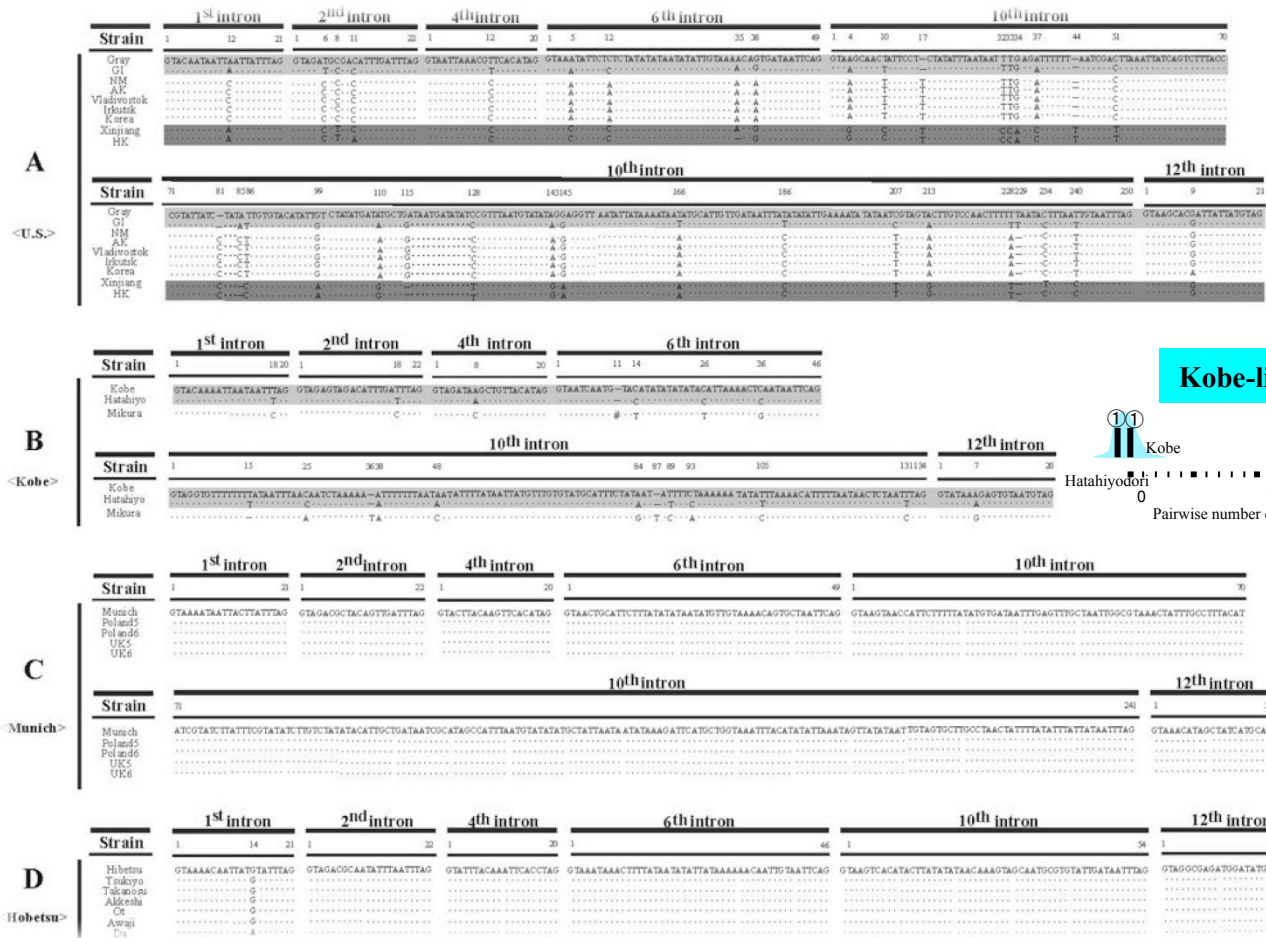


Fig. 9. Multiple sequence alignment of the *CCT7* introns

The individual intron at each position (1st, 2nd, 4th, 6th, 10th, 12th) was aligned by sequences with its same-position counterparts within lineage (A – D). Dots indicate identity with the consensus sequence. Line of letters with gray, dark-gray or white background highlights subgroups that appeared to be further divided within a lineage. #; A 27-nt insertion (CGCCT ATATA TATAT ATATA TGTTA TA) occurs after 10th position of the 6th intron in Mikura strain in the Kobe taxon.

(1) *CCT7*イントロン塩基配列を用いた原虫株の相互比較

6個の *CCT7* イントロンの結合塩基配列を用いた株間相互比較の結果、*B. microti* グループの U.S.、Kobe、Munich、Hobetsu の4系列中、U.S. と Kobe 系列については、それぞれさらに3亜系と2亜系に細分されることが明らかになった。(図8、9A、9B、10、11) この場合、配列差のほとんど(90%≦)が

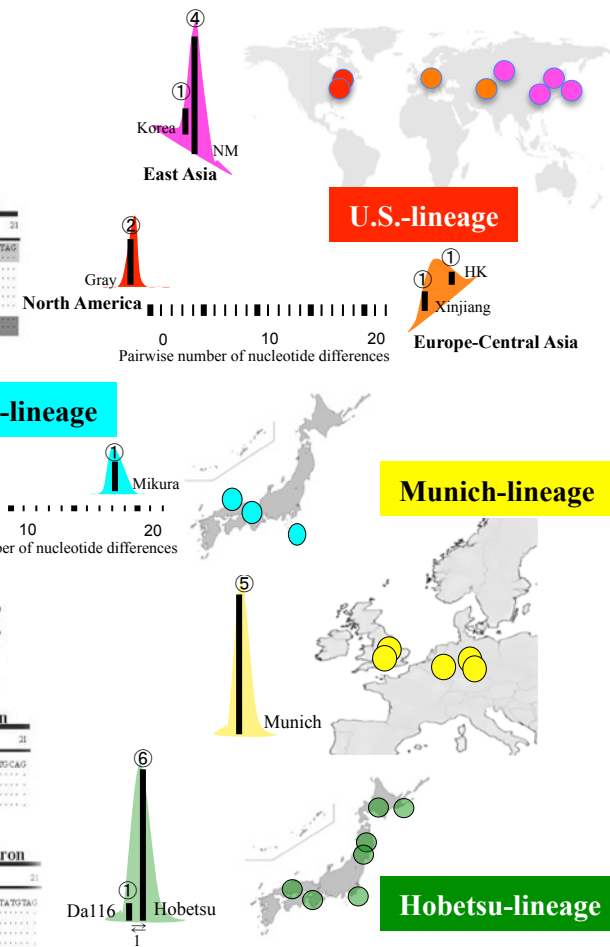


Fig. 10. Frequency of mismatch distribution

Frequency distribution of the number of observed pairwise nucleotide differences among parasite samples for the combined sequences of *CCT7* introns. Height of the black bar and numerals surrounded circle on top of the bar indicate sample incidence. The distance between two bars depicts the “pairwise number of nucleotide differences”. Colored circle on map shows the geographical origins of parasite strains isolated.

亜系と亜系の差で占められ、亜系内部での株間差はわずかでしかなかった。(図 9A、9B、10、11) このため *CCT7* イントロンの塩基配列差の大部分は進化的な事象を映す指標であって、生殖集団内のアレル変異や遺伝子型の違いを反映するものではないと考えられた。それぞれヨーロッパ3ヶ国あるいは日本各地と、異なる地域から得たサンプルを使用したにもかかわらず、Munich と Hobetsu 系列には配列差が 0 個またはごく僅かしか認められなかった。(図 9C、9D、10、11) DNA マーカーの種類にもよるが、Munich と Hobetsu 系の進化系統樹の枝長は U.S. 系列の 3-5 倍あり(図8; *CCT*、*β-tubulin*、*grp78* および *hsp70* CDS 系統樹参照)、それぞれに遺伝的多様性を生むだけの十分な進化時間があったと見られることから、一旦は両系列とも多様性を獲得したが、その後何らかの環境変化でほぼ絶滅し(瓶の口効果; Bottleneck effect がおきた)、たまたま残された1つのクローンから現在の状態まで復活したと推測された。この瓶の口効果

が原虫集団そのものにおこったのか、それとも宿主である哺乳類動物やダニが絶滅するなど、その他の間接的要因が誘因となったのかは不明である。

一方 Kobe 系列は、進化系統樹の枝長は十分に長いものの(図8)、分布は日本の幾つかのスポットに局限している(伊豆小笠原諸島の御蔵島、淡路島洲本町、島根県雲南市大東町で、宿主はアカネズミ、ヤチネズミ、ドブネズミなど)。(図 9B、10) これから判断して、Munich や Hobetsu 系列と同様に瓶の口効果がおきたと考えられる。ただし、系列内に大きな遺伝的多様性が存在し亜系として区別できることから、(1) 2つの遺伝的に異なるクローンが絶滅を免れた、(2) 1つのクローンが生き残ったが、ニッチの競争の少ない海洋孤島にたどり着いた原虫が急速に進化し、大きな遺伝的差異を持つことになった、の両方の説明が可能である。後者の説明にやや有利なデータとして、Mikura 株のイントロン塩基配列にみつかると 19 個の株間変異のうち、1箇所は 27 nt の挿入変異である。(図 9B) Kobe 系列の分布状況から判断してサンプル密度を増やすのは難しく、この面からの回答は期待出来ないが、*CCT7* 遺伝子以外の遺伝子からも塩基配列情報を集め、それらを使って詳細に解析すれば Kobe 系列のより詳しい進化史が明らかになるかもしれない。

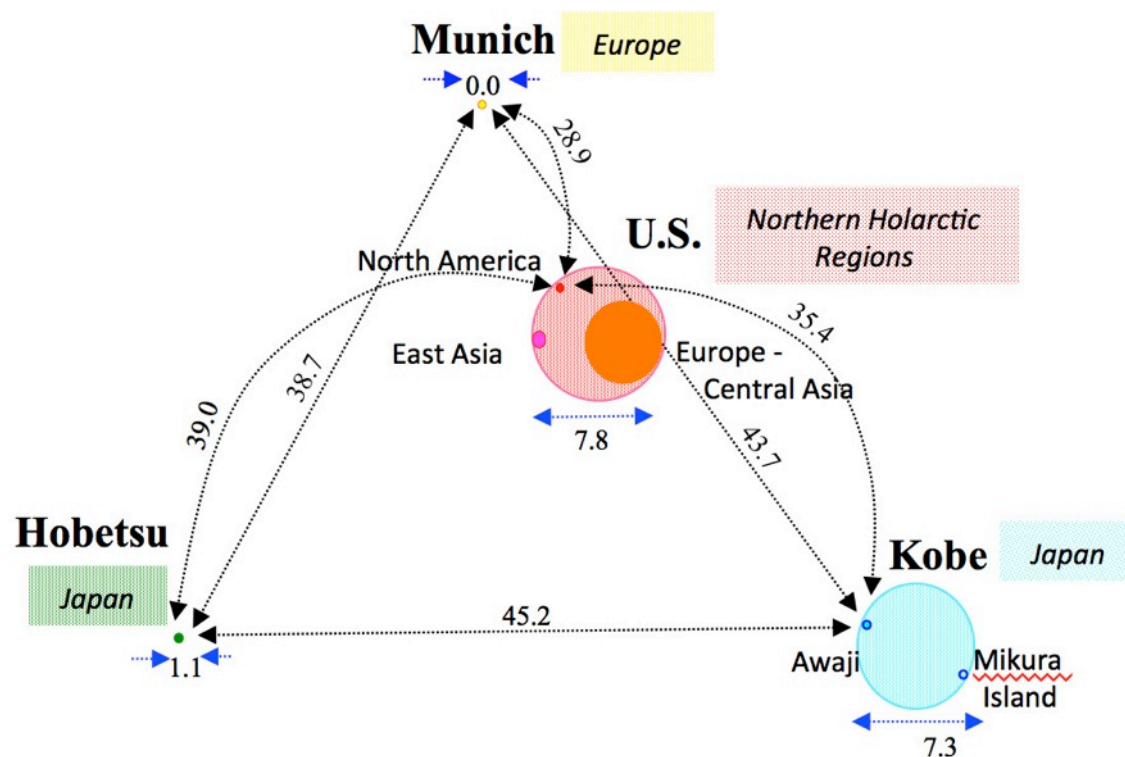


Fig. 11. Schematic patterns of population genetic variation

Percent of evolutionary distance (number of observed pairwise nucleotide differences) within and between the 4 lineages (U.S., Munich, Kobe and Hobetsu) of the *B. microti*-group parasites were generated in two ways. First, the within lineage diversity was measured by comparing with paired intronic sequences of all samples by each of the lineages or sub-lineages (see footnote in Fig. 9.) and the maximum extent of sequence diversity in percent is illustrated as to the diameter of circle. Second, percent of evolutionary distance was determined by comparing two pairs of *CCT7* ORF sequences from representative samples of each lineage and multiplied by the proportional value $\times 2.6$; described in the section of “(3) Nuclear DNA markers for assessing shallow phylogenetic relationships”. A three dimensional representation of evolutionary distance is illustrated.

(2) *B. microti* グループの4系列の相互間あるいは各系列内の遺伝的多様性の大きさ比較

B. microti グループの4系列の間あるいはそれぞれの系列内での遺伝的多様性の程度を2種類のDNAマーカ、すなわち *CCT7* CDS と *CCT7* イントロン塩基配列を使って測定した。(図 11) U.S. 系列は北米とアジアを含む北半球全域に分布し、Kobe 系列は日本国内に限られたスポットにしか存在しないが、ほぼ同レベルの遺伝的多様性があることが判った。すなわち、U.S. および Kobe 系列の系列内の株間比較で イントロン配列差の最大はそれぞれ 7.8% および 7.3% だった。(これらの値は系列間の遺伝的差異の 1/4 ~ 1/5 に相当する。) これに加えて、*B. microti* グループの4亜系については次の様な違いもすでに報告されている：(1) 遺伝的な差異(配列変異の程度)を *β-tubulin* および *CCT7* CDS で求め、他のピロプラズマ原虫種間の差異と比較すると、それぞれ別種扱いとなっている *B. odocoilei* と *B. divergence* の種間進化距離に近い。(2) *CCT7* イントロンのサイズは系列内ではよく保存されていて 1 nt 以内の違いしかないが、系列と系列の間には大きなサイズの違いがある。(19-254 nt; Nakajima et al., 2009; Fujisawa et al., 2011) (3) U.S. 系列(Gray株)と Kobe 系列(Kobe株)の間には免疫学的な交叉反応性(間接蛍光抗体法による)がほとんどない。U.S.東アジア亜系(NM69株)とU.S.亜系(Gray株)には交差反応があるが、同系同士の抗原抗体反応よりも弱い、など明らかな抗原レベルの違いがある。(Tsuji et al., 2001).

宿主ー原虫ーベクター関係

ピロプラズマ領域では集団の遺伝子構造解析が行われた例はほとんどなく、大半の原虫種の遺伝子構造は不明である。ただ、集団の構造解析は生殖集団としての原虫の各種の特性(生殖集団は有性生殖により、理論上、宿主、ベクター特性や病原性その他の特性を共有する)がどの様に進化して来たか、現在のどの範囲とどの頻度で共有され、さらに薬剤耐性や抗原変異などの変異が新たに獲得された場合にはどの様な速度で集団内に拡がるか、などの情報を得るうえで欠かせないステップであり、原虫症を理解しその感染防御対策をたてるために必須の解析である。

CCT7 イントロンの塩基配列に基づく解析から得られた我々の成績は *B. microti* グループに属する4系列がそれぞれ異なる集団の遺伝子構造パターンをもつことを明らかにした。(Fujisawa et al., 2011; Nakajima et al., 2009) Hobetsu と Munich 系列は、それぞれ日本とヨーロッパに広く認められる原虫群だが集団は遺伝的に均一である。一方 U.S. と Kobe 系列は前者がアジア大陸から北米大陸にかけて広く分布し、後者は日本国内のごく限られた場所にしか存在しないにもかかわらず、遺伝的多様性ではどちらもほとんど対等の規模であることが判った。(Fujisawa et al., 2011) 原虫集団の遺伝子構造は地理的な拡散や宿主あるいはベクターへの順化の行程を映す鏡と思われるため、集団の遺伝子構造の解析をさらに続け、将来的には遺伝子構造を決定づけてきた様々なファクターについて、その種類や関わりの程度を明らかにする必要がある。

(1) *B. microti* グループ4系列とその宿主

U.S. 系列はアジア大陸および北アメリカ大陸を含む北半球温帯域に広く分布し(米国、ドイツ、ポーランド、ロシア、中国、韓国、日本など)、小型齧歯類から食虫類(モグラの仲間)まで幅広い動物種に感染しているため、宿主域で原虫の系列を分けることはできない。例えば U.S. 型の北米亜系は、*Peromyscus* や *Microtus* の複数種(齧歯類)と *Blarina* (食虫類)が宿主で、日本を含むユーラシア亜系は *Apodemus*、*Myodes* (旧名 *Clethrionomys*)、*Microtus* の複数の種類(齧歯類)と *Sorex* の複数種(食虫類)が宿主である。{(表 1、2; 図 12; Zamoto et al., 2004A; Hunfeld et al., 2008 (総説)} Hobetsu と Munich 系列は *β-tubulin* や *CCT7* CDS に基づく進化系統解析で U.S. 系列から区別される独立集団だが(表 1、2; 図 12; Tsuji et al., 2001; Zamoto et al., 2004B)、それぞれ日本とヨーロッパに分布し、分布域が重なっている U.S. 型原虫とほぼ同じ宿主域特性(小型齧歯類から食虫類まで幅広い動物種に感染)を示す。

Table 1. Summary of field surveys for *B. microti* like parasites in small wild mammals in Hokkaido and Tohoku, Japan.

Animal species	No. of animals captured	No. of positives per examined								
		Microscopically ^{a)}	Nested PCR for beta-tubulin gene					IFAT ^{d)}	Isolation ^{e)}	
			Univ. ^{b)}	U.S. ^{c)}	Hobetsu	Kobe	Munich			
Nemuro	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	4	2/4	2/4	1/2	1/2	0/2	0/2	2/4	2/2
	<i>Clethrionomys rutilus</i>	10	1/10	1/10	1/1	1/1	0/1	0/1	1/10	1/1
	<i>Sorex caucutiens</i>	3	1/3	1/3	0/1	1/1	0/1	0/1	1/3	0/1
Akkeshi	<i>Apodemus speciosus</i>	4	0/4	1/4	1/1	0/1	0/1	0/1	1/4	1/1
	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	7	0/7	1/7	0/1	1/1	0/1	0/1	1/7	1/1
	<i>Clethrionomys rutilus</i>	2	0/2	0/2	0/2	.
	<i>Tamias sibiricus</i>	1	0/1	0/1	0/1	.
Horonobe	<i>Apodemus speciosus</i>	2	0/2	0/2	0/2	.
	<i>Apodemus argenteus</i>	3	0/3	0/3	0/3	.
	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	1	0/1	0/1	0/1	.
	<i>Sorex unguiculatus</i>	2	0/2	0/2	0/2	.
Kiyosato	<i>Apodemus speciosus</i>	1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	.	1/1
	<i>Apodemus argenteus</i>	2	0/2	0/2
	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	2	0/2	0/2
	<i>Sorex unguiculatus</i>	1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	.	1/1
Hobetsu ^{f)}	<i>Apodemus speciosus</i>	10	7/10	7/10	0/7	7/7	0/7	0/7	7/10	7/7
	<i>Apodemus argenteus</i>	2	0/2	0/2	0/2	.
	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	3	0/3	1/3	0/1	1/1	0/1	0/1	1/3	1/1
Ebetsu ^{f)}	<i>Apodemus speciosus</i>	22	0/22	0/22	0/22	.
	<i>Apodemus argenteus</i>	15	0/15	0/15	0/15	.
	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	7	0/7	0/7	0/7	.
	<i>Sorex unguiculatus</i>	1	0/1	0/1	0/1	.
Setana	<i>Apodemus speciosus</i>	11	0/11	0/11	0/11	.
	<i>Apodemus argenteus</i>	8	0/8	0/8	0/8	.
	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	1	0/1	0/1	0/1	.
	<i>Sorex caucutiens</i>	2	0/2	0/2	0/2	.
Okushiri	<i>Apodemus speciosus</i>	14	0/14	0/14	0/14	.
	<i>Apodemus speciosus</i>	23	0/23	0/23	0/23	.
	<i>Apodemus argenteus</i>	10	0/10	0/10	0/10	.
Shizukuishi	<i>Eothenomys andersoni</i>	1	0/1	0/1	0/1	.
	<i>Microtus montebelli</i>	1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1
	<i>Urotrichus talpoides</i>	2	0/2	0/2	0/2	.
	<i>Apodemus speciosus</i>	17	7/17	7/17	0/7	7/7	0/7	0/7	8/17	7/7
Takanosu	<i>Apodemus argenteus</i>	1	0/1	0/1	0/1	.
	<i>Urotrichus talpoides</i>	1	0/1	0/1	0/1	.
		197	21/197	24/197	3/24	22/24	0/24	0/24		23/24

- a) A thin layer of blood smear was stained Giemsa's solution and examined under microscopically.
 b) Nested PCR by using a set of primers broadly specific for all *B. microti* group parasites.
 c) Nested PCR with lineage-specific primers
 d) Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) was performed by using the antigens as parasite strains either in the U.S., Kobe, Hobetsu or Munich lineage.
 e) Isolation by inoculating blood samples into hamsters or erythrocyte-substituted SCID mice.
 f) Samples used were those described previously (Tsuji et al., 2001).

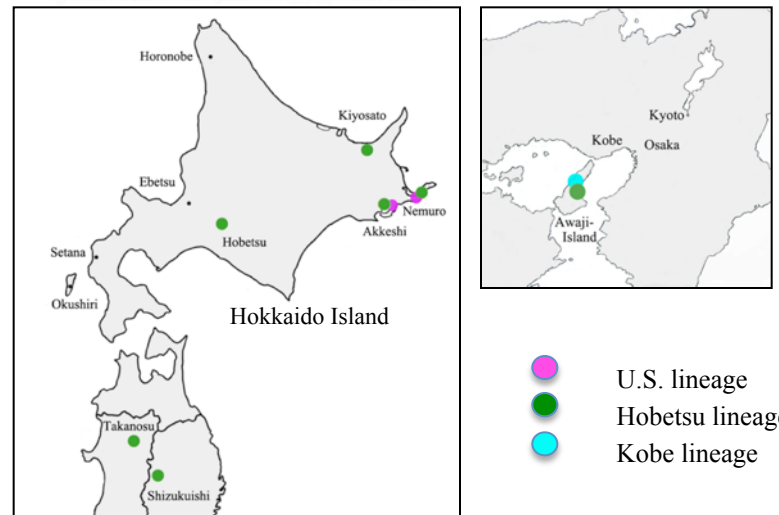
Fig. 12. Field surveys for *B. microti*-group parasites in small wild mammals. After Tsuji et al., 2001; Zamoto et al., 2004B.

Epizootiologic field surveys were carried out in two islands, Hokkaido and Awaji, in Japan. The blood specimens of wild small mammals were collected and tested by PCR for the presence of the *B. microti*-parasites. To classify the *B. microti*-group parasites detected, all of the rDNA-positive samples were further examined by lineage-specific PCR base on β -tubulin gene.

Table 2. Summary of field survey of *B. microti* like parasites among small wild mammals in Japan from 1999 to 2000

Prefecture	Site	Species	No. of animals trapped	No. positive/no. tested by:						No. of animals with the following rDNA genotype ^e	
				Microscopy ^{a)}	PCR ^{b)}	IFAT ^{c)}	Isolation ^{d)}	Kobe	Hobetsu		
Hokkaido	Hobetsu	<i>Apodemus speciosus</i>	10	7/10	7/10	7/10	7/9	0	7		
		<i>Apodemus argenteus</i>	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0	0		
		<i>Clethrionomys rufocanus</i>	3	0/3	1/3	2/3	1/3	0	1		
Ebetsu		<i>Apodemus speciosus</i>	22	0/22	0/22	0/22	0/11	0	0		
		<i>Apodemus argenteus</i>	15	0/15	0/15	0/15	0/8	0	0		
		<i>Clethrionomys rufocanus</i>	7	0/7	0/7	0/7	0/4	0	0		
		<i>Sorex unguiculatus</i>	1	0/1	0/1	0/1	ND	0	0		
Chiba	Ohtaki	<i>Apodemus speciosus</i>	2	2/2	2/2	2/2	2/2	0	2		
Shiga	Yamanaka	<i>Apodemus speciosus</i>	1	1/1	1/1	1/1	1/1	0	1		
Hyogo	Kobe	<i>Apodemus speciosus</i>	1	0/1	0/1	1/1	0/1	0	0		
		<i>Apodemus speciosus</i>	1	0/1	0/1	0/1	ND	0	0		
Kanzaki		<i>Apodemus speciosus</i>	8	0/8	0/8	0/8	ND	0	0		
		<i>Apodemus argenteus</i>	1	0/1	0/1	0/1	ND	0	0		
Awaji		<i>Apodemus speciosus</i>	7 ^{f)}	4/7	4/7	4/7	4/7	2	2		
		<i>Crociodura dsinezumi</i>	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0		
Shimane	Daito	<i>Apodemus speciosus</i>	14	4/14	7/14	4/8	3/4	0	3		
		<i>Apodemus argenteus</i>	2	0/2	0/2	0/2	ND	0	0		
		<i>Eothenomys smithii</i>	3	0/3	0/3	0/3	ND	0	0		
Tokushima	Anan	<i>Apodemus speciosus</i>	11	1/11	2/11	3/11	2/3	0	2		
Total			112	19/112	24/112	24/106	20/56	2	18		

- ^{a)} Detection of parasitized RBCs by microscopy of thin-smear blood films.
^{b)} Detection of babesial rDNA by nested PCR.
^{c)} IFAT titers that were higher than 1:200 against either strain Kobe or strain Ho234 were taken as positive.
^{d)} Isolation of *B. microti*-like parasites by inoculation of blood specimens into splenectomized hamsters. ND, not done.
^{e)} Determined by sequencing of the rDNA amplified from the isolated parasites.
^{f)} Including two *A. speciosus* mice included in a previous study (35).



Kobe 系列は限られた小区域に限局して分布するが（伊豆小笠原諸島の中の御蔵島、淡路島の洲本町、島根県雲南市大東町；Wei et al, 2001; Tabara, et al., 2006）、分布域は Hobetsu 系列と重なり、宿主動物の種類 {*Myodes*、*Apodemus*（齧歯類）など} も Hobetsu 系列と同じである。同一個体に、Kobe 系列と Hobetsu 系列の原虫が重複して感染している例もみつかっており、これら 2 系列の原虫の宿主域も区別できないらしい。（表 2） なお、御蔵島では *Rattus* spp. から Kobe 型原虫が見つかったことがあるが、その後調査が行われたにもかかわらずこれ以外には陽性例が見つからない。それ故、Kobe 型原虫が今も御蔵島に存続しているか否かは、定かでない。

B. microti グループの原虫は進化系統学的には異なる複数集団に分かれるが、何れも様々な動物種に対して感受性を持ち、ヒトにも感染するなど非常に幅広い宿主域特性を有しているうえ（Munich 系列の除く）、動物種毎の陽性率も同じ地域であれば近似するため、原虫系列による宿主特異性の差異はなさそうである。{Hunfeld et al., 2008 (総説)}

(2) 媒介ダニ

米国では、ナンタケット島（ボストン東方のリゾート島。島の生物叢が単純だったことが短期間でのライフサイクルの確定を可能にした。）での詳細な疫学調査と多数の実験室実験によって *Ixodes scapularis* (別名 *I. dammini*) が *B. microti* の主たるベクターと確定されている。{Hunfeld et al., 2008 (総説)} それ以外の世界各地では、ベクターに関する詳細なほとんどない。それ故、各地に分布している *B. microti* グループの原虫が、そこに生息する何種類かの Ixodid species によって媒介されているのか、あるいは個々の原虫系列を個々の媒介ダニ種が媒介しているのか、明確でない。特に、日本には原虫系列の分布域が重なる地

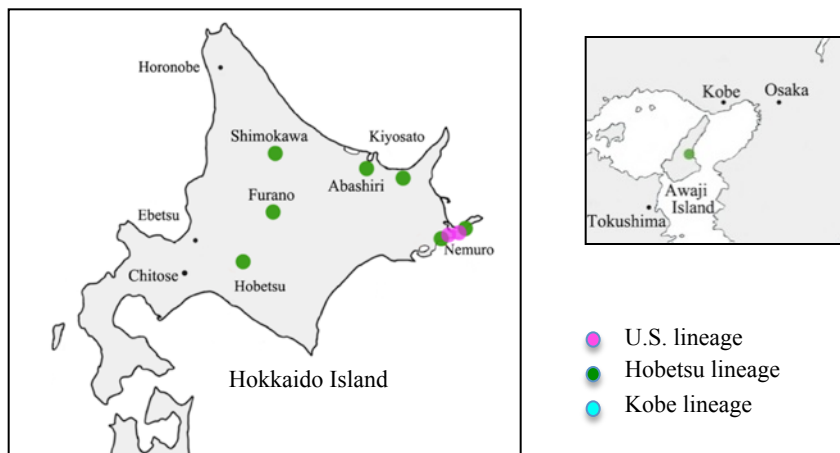


Fig. 13. Field surveys for *B. microti*-group parasites in *Ixodid* ticks in Japanese nature.

Epizootiologic field surveys were carried out in two islands, Hokkaido and Awaji. Ticks were tested by PCR for the presence of *B. microti*-parasites. To classify the parasites detected, all of the rDNA-positive samples were further examined by lineage-specific PCR base on β -tubulin gene. (After Zamoto-Niikura et al., 2012)

Table 3. Number of ticks collected in Hokkaido and Awaji islands, Japan.

Areas	Tick species						Total
	<i>I. ovatus</i>	<i>I. persulcatus</i>	<i>I. turdus</i>	<i>I. tanuki</i>	<i>H. flava</i>	<i>H. douglasi</i>	
Hokkaido	2744	1274	2	1	2	45	3708
Awaji	190	0	23	0	89	0	302

Table 4. Detection of *B. microti* like rDNA by PCR in the field collected ticks.

Tick species	Survey area	No. of ticks examined ^a	No. of ticks pooled	No. of ticks tested	No. of PCR-positive samples	Minimum infection rate(%) ^b
<i>I. ovatus</i>						
Hokkaido	Nemuro	48	2 to 3	19	4	8.3 ^c
	Kiyosato	65	5	13	8	12.3
	Shimokawa	100	5	20	2	2.0
	Aibetsu	85	5	17	0	0
	Furano	115	5	23	3	2.6
	Hobetsu	140	5	28	10	7.1
	Ebetsu	36	3	12	0	0
	Chitose	68	4 to 5	15	0	0
Awaji	Sumoto	180	5	36	11	6.1
	Subtotal	837		183	38	5.5
<i>I. persulcatus</i>						
Hokkaido	Nemuro	139	3 to 5	33	2	1.4
	(Nymph)	196	1	196	0	0
	Horonobe	42	3	14	0	0
	Kiyosato	105	5	21	0	0
	Shimokawa	15	5	3	0	0
	Aibetsu	85	5	17	0	0
	Furano	44	5	15	0	0
	Hobetsu	36	3	13	0	0
	Ebetsu	15	5	3	0	0
		Subtotal	1656		542	2
Other tick species						
	Six areas ^d	162	1	162	0	0

^a Ticks examined were all adult except one case of *I. persulcatus* samples collected at Nemuro.

^b Values(%) were calculated by comparing the number of pools that were PCR positive for the *B. microti*-group to the total number of ticks examined. The calculation was based on the assumption that each PCR-positive pool contains at least one tick with detectable *B. microti*-group parasite(s).

^c Considering the impact of the comparison of MIRs, the possible MIR would be between 2 and 8.3% when 5 ticks were pooled.

^d Nemuro, Horonobe, Kiyosato, Hobetsu and Sumoto were included.

域が2箇所存在する。(北海道根室市は U.S. と Hobetsu 系列が、淡路島洲本町は Kobe と Hoabetsu 系列が重なる: Tsuji et al., 2001; Zamoto et al., 2004B) そこにどのような種類のダニが棲息し、それらがどのようなベクター特性を示すかは、非常に興味深い問題である。以下に、我々がこの2箇所とその周辺域で行った疫学調査の結果を示す。(Zamoto-Niikura et al., 2012).

旗振り法でダニ収集を行い、上記2地点とその周辺地域から6種、4010匹のダニを採取した。(表3) 全種類の *Babesia* の 18S rDNA を検出できるプライマーを用いてPCR法で検査したところ、*Ixodes ovatus* と *I. persulcatus* だけが陽性となり、他のダニ種のサンプルからは陽性反応が出なかった。次にこの陽性サンプルに対して、rDNA をターゲットにした原虫系列特異的なPCR試験を行った。(表4) Kobe 系列を保有するダニは見つからなかった。*B. microti* 陽性の *I. ovatus* は、淡路島でも北海道でも多数見つかり、その最小感染価 (MIR) は最高12.3%、根室市の *I. ovatus* の MIR は8.3% だった。これに対して、535匹の *I. persulcatus* からは Hobetsu 型原虫が検出されることはなかった(根室市のサンプルも Hobetsu 型原虫を保有しなかった)。一方、根室市で採取された139匹の *I. persulcatus* 中2匹が U.S. 型原虫陽性となった。(MIR=1.4%) さらに根室市で採取した48匹の *I. ovatus* は1匹も U.S. 型原虫を保有していなかった。(表4) *I. persulcatus* は *I. ovatus* と同様に北海道全域に広く分布し、*Apodemus*、*Myodes*、*Microtus*、*Sorex* などを吸血しているため、Hobetsu 型原虫感染赤血球を吸血する可能性は *I. ovatus* と同程度と推定される。それにもかかわらず Hobetsu 型原虫を保有する *I. persulcatus* は皆無だったことから、*I. persulcatus* は Hobetsu 型原虫に対して感受性が低く吸血によって原虫を取り込んだとしても脱皮までの何ヶ月間に排除してしまうと考えられた。

ハムスターを用いて *I. ovatus* と *I. persulcatus* の原虫伝達試験を行ったところ、*I. ovatus* が Hobetsu 型原虫を、*I. persulcatus* が U.S. 型原虫を伝達することが確認された。

I. ovatus の分布域と Hobetsu 型原虫の分布域はほとんど一致する(但し、大きな市街地とその周辺域は原虫陰性)。一方 *I. persulcatus* は北海道全域に見られるが U.S. 型原虫は根室市だけに見つかり(図12, 13)、原虫とベクターダニの分布域に不一致が見られる。(図12, 13) この理由は明らかではない。ただ、根室市の野鼠は Hobetsu 型と U.S. 型原虫の両方を同頻度で保有しているため(表1, 2)、*I. ovatus* の若ダニにも *I. persulcatus* の若ダニにも同等の吸血チャンスがあるはずである。ところが、旗振り法で捕らえられた成ダニの MIR は大きく異なっていた(*I. persulcatus* は1.4%で *I. ovatus* は8.3%)。この MIR の差異は、*I. persulcatus* の U.S. 型原虫伝達能力が *I. ovatus* の Hobetsu 型原虫伝達力よりもはるかに劣ることを示していると考えられる。それ故1つの可能性ではあるが、*I. persulcatus* のベクター活性が十分でないために、結果的に U.S. 型原虫の分布域に偏りが生じた可能性が考えられる。(図12)

伝達能力はヒトへの感染危険度にも置き換えられる点で重要な指標である。根室市の *I. persulcatus* の MIR は1.4% だったが、その値を患者が多数報告されている米国北東部(ナンタケット島の *I. scapularis* の U.S. 型原虫の保有状況 --- Piesman & Spielman, 1980; Liu, Y. 2012) と比較してみると1/10以下であり、非常に低い。^{注9)} U.S. 系列の原虫は北米に限らずヨーロッパから東アジアにかけて、ユーラシア大陸温帯域に広く分布している。それに関わらず報告されている患者のほとんどは米国に限られ、ヨーロッパやアジアでの患者報告はゼロかごく希である。その理由として、(1) U.S. 系列の地理的3亜系(北米、東アジア、ヨーロッパ・中央アジア)はヒトに対する感受性で違いがある、(2) 米国の臨床医に *B. microti* の知識が浸透しているために病気の見落としが少なく患者発見効率が高い、(3) 北米の *I. scapularis* のベクター活性が高くそれが多数の感染者を発生させる大きな理由になっ

注9) *B. microti* 原虫および Ixodid の進化系統樹の対応関係をみると(図14)、U.S. 系列の3亜系は全て *I. ricinus* complex に所属する姉妹ダニ種が媒介していることが判る。つまり、進化系統解析情報と公衆衛生上に必要な情報(ベクター特性やベクター活性など)の対応関係の解明は、相当細かな(浅い)レベルの進化系統解析によって初めて可能であることが示唆される。現在、最も一般的に使われるDNAマーカーは18S rDNAだが、このCDSの配列差に置き換えて比較すると、今回取り上げたU.S. 系列内の北米亜系(Gray株)とヨーロッパ・中央アジア亜系(Xinjiang株)差が0.12%(1665 nt中に2箇所の変異)であるのに対して、既知の原虫種間の進化距離は概ね1~3%と10~20倍になっている。(Nakajima et al., 2009; Jinnai et al., 2009)ピロプラズマ原虫全般に、もしかするとアルベオラータについても、高感度DNAマーカー使って検証してみる必要があるだろう。。しかし高感度DNAマーカーによる検討はほとんど行われていないため、この推論の将来の検討を待たねばならない。

ている ---などが考えられる。これらの中で、上述の我々の成績は (3) 説を支持する 1 つの根拠となるかも知れない。

B. microti のベクター特異性とベクター活性に関する日本および北米の結果をヨーロッパのそれとを比較すれば、より高い精度の推論が可能と思われる。しかし、ヨーロッパには Munich と U.S. の 2 系列が重なる様に分布することが判っているものの、多くの研究報告が、感度が低く原虫系列をきれいに型別できない DNA マーカーの解析に基づいているため、残念ながら正確な見積もりが困難な状態にある。

(3) U.S. 系列原虫の進化史

日本に存在する *B. microti* グループの原虫は宿種域が重なり、分布域も一部重なっている (図 12、13) にもかかわらず、進化系統解析では U.S.、Kobe、Hobetsu のクラスターに分かれる。これは U.S.、Kobe、Hobetsu 系列がかなり以前から別々に進化してきた独立の生殖集団であることを意味している。同様に U.S. 系列内部でも、宿種域に差が無いにも係わらず、進化系統樹上では北米、東アジア、ヨーロッパ・中央アジアの地理的 3 垂系に分かれる。

(図 14、15) 複数の進化系統樹 (図 8) の樹形と枝長から、また、その非常に広い分布域 (図 15) から推察して、*B. microti* の中では U.S. 系列が最も新しく出現した集団で、それが繁栄するにつれて分布域を急速に北半球全域に広げたと推測される。これに、前節で述べた原虫の宿種およびベクター特性

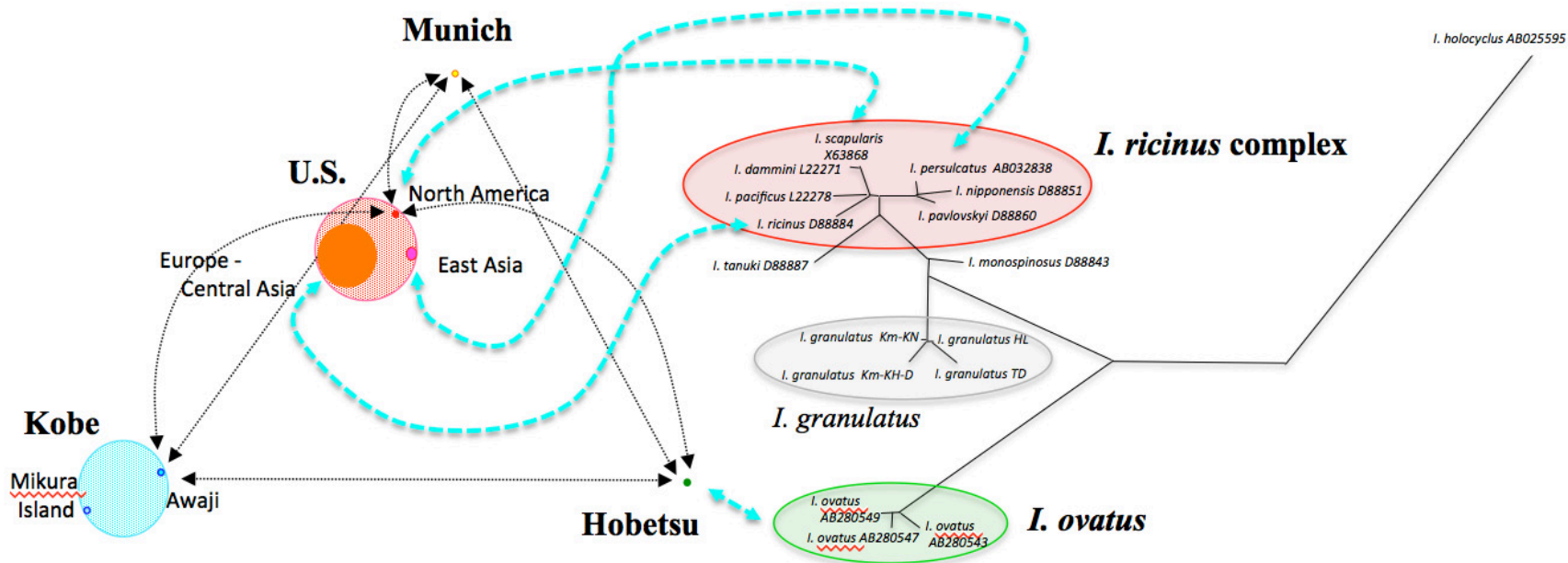


Fig. 14. Cross-species matches in vector specificity for *B. microti*-group parasites.

Schematic patterns of population genetic variation of *B. microti*-group parasites (left). Phylogenetic relatedness of ITS2 sequences from various Ixodid ticks (right). Figure is modified from Zamoto-Niikura et al., 2012 (left, see legends in Fig. 11) and Chao et al., 2011 (right). Pale-blue dotted line represents the parasite lineage - primary vector relationship.

(図 14、Zamoto-Niikura et al., 2012)を重ね併せて推測すると、U.S. 系列の共通祖先はまず *I. ricinus* complex の共通祖先にベクターシフトし、媒介ダニの繁栄に乗じて分布域を拡大した。その結果ベクターの地理的隔離がおり、それに伴って原虫集団にも生殖隔離がおこって、種分化あるいは亜種化が進んだ、^{注10)} と考えられる。(Nakajima et al., 2009; Fujisawa et al., 2011; Zamoto-Niikura et al., 2012)

原虫が宿種あるいはベクターと共進化するという考えは以前から提唱されている。しかし、進化系統解析など具体的なデータをもってこれが証明された例はこれまでのところ希で、^{注10)} 上記の成績は U.S. 型原虫と *I. ricinus* complex の共進化を示唆する数少ない具体例であろう。^{注11)}

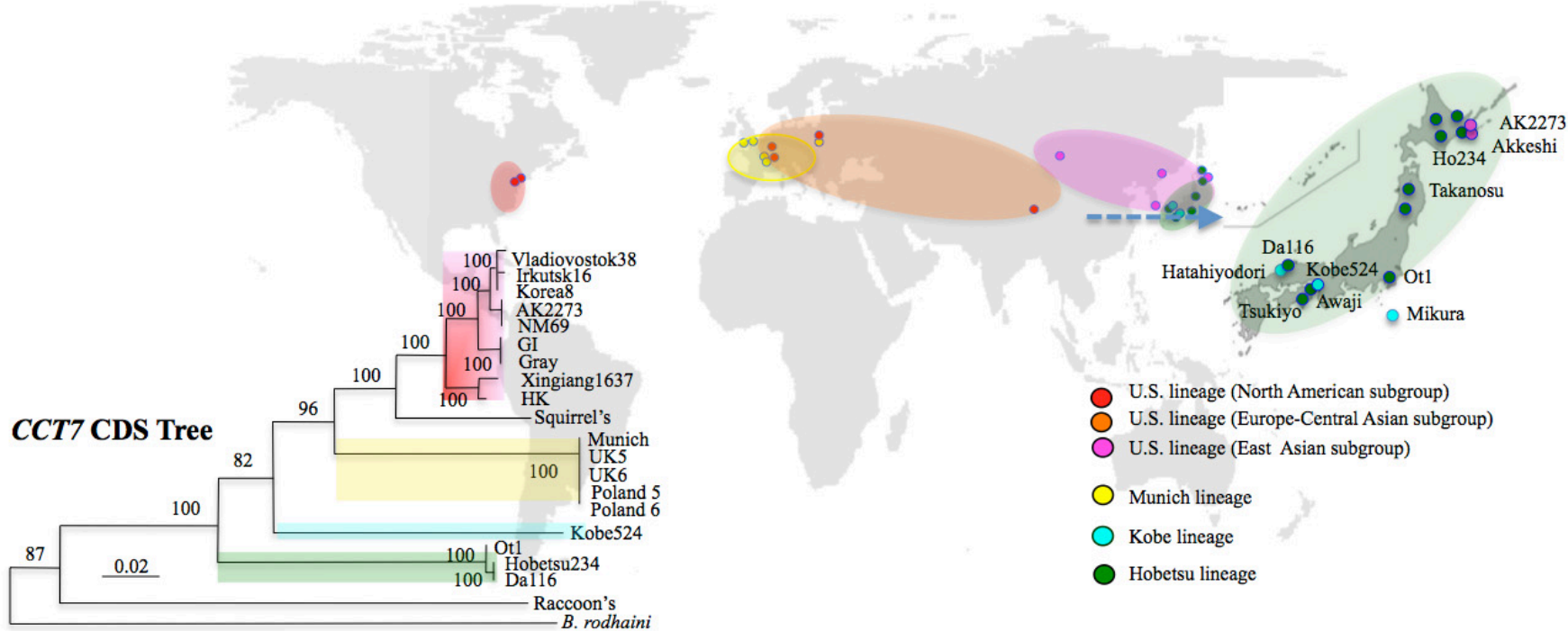


Fig. 15. Predicted distributions of the 4 lineages of *B. microti*-group and their phylogenetic relationships

Geographic origin of the parasite strains (see Figs. 6, 12, 13) and the spot where given lineage of parasites detected are all plotted on the Figure. Considerable endemic areas for each of the 4 parasite lineages are covered by translucent color. CCT7 CDS tree shown as shown Fig. 6 is also placed on this figure for referring evolutionary relatedness of the parasite strains in the *B. microti*-group. After Nakajima et al., 2009; Fujisawa et al., 2011; Zamoto et al., 2004A, B; Zamoto-Niikura et al., 2012.

注10): ダニ自身の移動距離は小さいので大陸レベルの移動や大陸を越えて移動する不可能は低い。おそらく哺乳類動物の背中に乗って旅を重ね移動を果たしたのだろう。

注11): 種分化については、どのようなシナリオが妥当かについて様々なシミュレーションが生まれ検証するかたちで、多くの検討が行われて来た。種分化の原動力となる遺伝的多様化に関する因子として、時間的要素としては漸次的 vs 突発的=異種間交雑の対立意見があり、空間的要素でも異所的 vs 同所的の両面から議論されている。さらに種分化のメカニズムに関して、生態学的順化、生殖隔離あるいは順化以外の遺伝子浮動が論議されており、未だ決着を見ていない。

おわりに

日本第1号のバベシア患者の診断を確定し (Saito-Ito et al., 2000; Wei et al., 2001; Tsuji et al., 2001)、(故)辻教授と座本博士がハーバード大学を訪問、Dr. Telford S.R., III に "B. microti グループの株間相互 (Kobe, Hobetsu, U.S. (Gray)) に無視できないほどの遺伝的な差異がある"、と指摘したのが2002年冬。その後まもなく B. microti は species complex と表記されることになった。(Goethert & Terford, 2003; Zamoto et al., 2004B) しかし、この程度の塩基配列差がどのような生物学的事象に対応するか明確でなく、また B. microti の起源が進化系統解析ではっきりしないことも気がかりだった。答を探るため新しい進化系統解析法にチャレンジした。1個の CCT7 遺伝子を4種類の進化マーカー (イントロン位置パターン、イントロンサイズ、CDSおよびイントロン塩基配列) として使い分ける手法である。チャレンジは成功し、それまで出来なかった非常に広い範囲の進化史 (18S rDNAで解析困難な非常に遠い過去から、実在生殖集団の直近の進化史まで) をまんべんなく高精度で解明出来る様になった。(Nakajima et al., 2009; Fujisawa et al., 2011) イントロンの位置とサイズをマーカーにする解析では、B. microti とその関連原虫は Babesia sensu stricto や Theileria と全く違うパターンを示した。この結果を受けて、論文 (Nakajima et al., 2009) には "ゲノムレベルの違いがあるかも知れない" と書いた。それを目にした Dr. Emmanuel, C. と Choukri, B.M. からゲノムプロジェクトへの勧誘を受けた。プロジェクトへの参加は断ったが、2012年7月に公表された彼らのゲノムデータ (Emmanuel, et al., 2012) は我々の推論がほぼ当たっていたこと示すものだった。この2-3年に、我々は CCT7 CDS と CCT7 イントロンの塩基配列をマーカーにした B. microti 集団の遺伝子構造解析 (Nakajima et al., 2009; Fujisawa et al., 2011)、宿主動物あるいはダニと原虫集団との相関性 (Zamoto et al., 2004; Zamoto-Niikura et al., 2012) に関する論文を公表した。そこに述べた様に、B. microti U.S. グループの亜系列間 (北米、東アジア、ヨーロッパ・中央アジア) の進化距離は 18S rDNA CDS の配列差換算で 0.1 - 0.2 % でしかない。しかし驚くべきことに、この 0.1 - 0.2 % レベルの区分がベクターダニの種 (それぞれ I. scapularis, I. persulcatus, I. ricinus) に対応することが判った。(共進化関係にあると推定される) (Zamoto-Niikura, et al., 2012) このレベル (0.1 - 0.2%) での検討例は、これまでのところほとんどない。しかし、得られた結果は原虫の遺伝や生態学的な観点からはもちろん、公衆衛生学上も非常に重要なものだった。すなわち原虫亜系列レベルでベクターの種類が違いベクター活性が違う、つまりヒトの感染危険度が違うことを、はじめて示す結果になった。

現在、ピロプラズマ原虫 (大半は家畜の病原体) の種区分は 18S rDNA の CDS の変異率換算で 1~3% レベルで行われている。もしもこれに不都合があるなら、分類基準として重要視した "宿主域・ベクター特性" に問題がある *12) --- すなわち宿主種とベクターが同じなら同一生殖集団 (同種または亜種) とみなす --- 設定に問題があったことになる。この問題の背景は、(1) 家畜化に伴う「宿主/ベクターシフト」がもたらす問題を軽視し過ぎた。(2) 既知ピロプラズマ原虫の大半が家畜の病原体だった、の何れかにあると考えられる。

*12): ピロプラズマ原虫は本来の宿主以外には感染しないと、かつては信じられおり、それ故宿主域特性は非常に安定な分類指標として使われて来た。しかし近年の遺伝子解析に基づくデータから、ピロプラズマ原虫の多くがかなり広範囲の動物に感染することが明らかになった。{ Hunfeld et al., 2008 (総説) } 当然、「宿主/ベクターシフト」も容易におこると考えられる。この前提に立てば次の様な推論が可能である。すなわち、各地の野生動物に常在していた異なる複数種類のピロプラズマ原虫が、家畜化の過程で1箇所に集められ、そこで「宿主/ベクターシフト」を行って最適な新型ライフサイクルを樹立した。そしてこのとき、それまで宿主/ベクター特性が違った様々な原虫集団が「家畜」という1種類の宿主集団に向かって (おそらくベクターも1方向に) 「宿主/ベクターシフト」した --- と考えられる。すなわち、様々な原虫種が統一の「同居型ライフサイクル」を完成させた可能性がある。つまり、現在我々が知っている家畜のピロプラズマが、宿主域もベクター特性も同じだからと言って、同じ種 (species) と言うことにはならない --- ことを意味している。実際、ウシの B. ovata や T. sergeneti は進化系統解析で複数のクレードに別れるが、それらを宿主域やベクター特性で区別することは出来ない。(Dr. Arai, S., personal communication)

我々は、その数や世代交代の速さから原虫の進化速度が哺乳類宿主やベクターよりもはるかに速いと思いがちである。これまでに述べてきた結果は原虫の進化速度も哺乳類宿主やベクターのそれとさほど変わらないことを示唆している。だとすれば、現在我々が種（生殖集団）としているものが、実際は複合種や属なのかも知れない。（注¹）参照）原虫感染症を確定診断し、公衆衛生的対応策の策定が必要だが、そのためには的確に生殖集団の規模を確定する必要がある。たとえ遠廻りに見えても、原虫のサンプリング密度を上げ（未発見種を減らし）、新しいDNAマーカーを開発し、様々な原虫の初期進化から集団の遺伝子構造まで、広範囲に高精度で解明する必要があるだろう。

謝辞

ピロプラズマ原虫症の研究のためのさまざまな基本技術の確立とここに紹介したほとんど全ての研究の立案と推進に中核な役割を果たし、結果の公表に尽力された(故)辻正義 教授 { (旧名) 酪農学園大学獣医学部実験動物学教室 } に深謝する。またピロプラズマ症研究のパイオニアの一人で、我々にピロプラズマ研究を始めるきっかけを与え、我々の研究を指導し支え続けて頂いた(故)高橋清志 教授 { (旧名) 酪農学園大学獣医学部内科学教室 } に深く感謝する。

また、ここに紹介した研究は以下の先生方および酪農学園大学獣医学類感染・病理教育群実験動物学ユニット（旧名 獣医学部実験動物学教室）の卒業生の皆さんの献身的な努力と的確で示唆に富む指摘および貴重なサンプルの収集と提供によって成されたものであることを付記する。

（敬称略）中島瑠衣、陣内理生、藤澤幸平、的場洋平、平田晴之、萩原克郎、高橋樹史、浅川満彦、Kim, S.-J. (酪農学園大学)、座本-新倉綾、神山恒夫（国立感染症研究所）、川淵一倉田貴子（大阪府衛生研究所）、寺田裕（農研機構畜産草地研究所）、高島郁夫、苅和宏明、東市郎、坪田敏雄、有川二郎、吉松一森松組子、小沼操、前出吉光（北海道大学）、中尾稔（旭川医科大学）、実方剛（鳥取大学）、生田和良（大阪大学）、磯貝浩（札幌医科大学）、日置恭司（日本クレア株式会社）、川合覚（獨協大学）、松井利充（神戸大学）、斉藤一伊藤あつ子（兵庫医療大学）、五十嵐郁夫（帯広畜産大学）、太田方人（動物衛生研究所）、筏井 宏実（北里大学）、小野健一郎（東京大学）、滝田裕子（盛岡市動物公園）、田原研司（保健環境科学研究所）、Marek Sawczuk, Bogumila Skotarczak (Szczecin Univ., Poland)、Cho, S.-H. (NIH, Republic of Korea)、Wei, Q. (Inst. Lab. Anim. Sci., Chinese Acad. Med. Sci., Beijing, China)、Gray, S. J. (Univ. College Dublin, Ireland)、Holman P. J. (Texas A&M Univ., U.S.A.)

英文作成にあたって貴重な指摘と討議を頂いた次の両先生に深謝する。

（敬称略）Danny H.- K. Jokl (Columbia Univ. Med. Center, NY, U.S.A.)、Nell L. Kennedy (酪農学園大学)

なお、ここに紹介した研究の一部は、酪農学園大学学術フロンティア推進事業「新興・再興感染症の近縁要因の分子疫学的、生態学的検討」—平成15年度～平成19年 {森田千春、石原智明、福本真一郎、黒澤隆、上野弘志、田村豊（酪農学園大学）、新井智（国立感染症研究所）、Kim, T.-S. (NIH, Republic of Korea)（敬称略）} によって実施されたものである。またこれらの研究の一部は、酪農学園大学学術フロンティア推進事業、文部科学省科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金、酪農学園大学共同研究補助金の支援を受けて行われたものである。

引用文献

- Zamoto, A., Tsuji, M., Wei, Q., Cho, S-H., Shin, E-H, Kim, T-S., Leonova, G. N., Hagiwara, K., Asakawa, M., Kariwa, H., Takashima, I., Ishihara, C. (2004A) Epizootiologic survey for *Babesia microti* among samall wild mammanls in Northeastern Eurasia and a geographic deversity in the *b-tubulin* gene sequences. J. Vet. Med. Sci., 66: 785-792.
- Zamoto, A., Tsuji, M., Kawabuchi, T., Wei, Q., Asakawa, M., Ishihara, C. (2004B) U.S.-type *B. microti* isolated small wild mammals in Eastern Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. 66: 919-926.
- Goethert, H. K., Telford, S. R., III (2003) What is *Babesia microti* ? Parasitology. 127: 301-309.
- Nguyen, H. D., Yoshihama, M. Kenmochi, N. (2007) The evolution of spliceosomal introns in Alveolates, Mol. Biol. Evol. 24: 1093-1096.
- Kuo, C.-H., Kissinger, J. C. (2008) Consistent and contrasting properties of lineage-specific genes in the apicomplexan parasites *Plasmodium* and *Theileria*, BMC Evol. Biol. 8: 108.
- Roy, S. W., Penny, D. (2006) Large-scale intron conservation and order-of-magnitude variation in intron loss/gain rates in apicomplexan evolution. Genome Res. 16: 1270-1275.
- Perkins, S. L., Schall, J. J. (2002) A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. J. Parasitol. 88: 972-978.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J. C. (2003) Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. Vet. Parasitol. 114: 173-194.
- Allsop, M. E. P., Allsopp, B. A. (2006) Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1081: 509-517.
- Tibayrenc, M. (2003) Genetic subdivisions with *Trypanosoma cruzi* (discrete typing units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. Kinetoplastid Biol. Dis. 2: 12.
- Hunfeld, K.-P., Hildebrandt, A., Gray, J. S. (2008) Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. Int. J. Parasitol. 38: 1219-1237.
- Mackenstedt, U., Gauer, M., Mehlhorn, H., Schein, E., Hauschild, S. (1990) Sexual cycle of *Babesia divergens* confirmed by DNA measurements. Parasitol. Res. 76: 199-206.
- Heitman, J. (2006) Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. Current Biol. 16: R711-R725.
- Heitman, J. (2009) Love the one you're with. Nature 460: 807-808.
- Anderson, T. J. C., Haubold, B., Williams, J. T., Estrada-Franco, J. G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I. D., Brockman, A. H., Nosten, F., Ferreira, M. U., Day K. P. (2000) Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol. Biol. Evol. 17: 1467-1482.
- Jinnai, M., Kawabuchi-Kurata, T., Tsuji, M., Nakajima, R., Hirata, H., Fujisawa, K., Shiraki, H., Asakawa, M., Nasuno, T., Ishihara, C. (2010) Molecular evidence of a multiple genotype infection of wild Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) by a new *Babesia* sp. UR1. Vet. Parasitol. 173: 128-33.
- Wei, Q., Tsuji, M., Zamoto, A., Kohsaki, M., Matsui, T., Shiota, T., Telford, III S. R., Ishihara, C. (2001) Human babesiosis in Japan: Isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. J. Clin. Microbiol. 39: 2178-2183.
- Kadereit, S., Hines, P.J. (2005) An overview of stem cell research. New England Law Review, 39, 607-622.
- Cogswell, F. B. (1992) The hypnozoite and relapse in primate malaria. Clin. Microbiol. Rev. 5: 26-35.
- Nakajima, R., Tsuji, M., Oda, K., Zamoto-Niikura, A., Wei, Q., Kawabuchi-Kurata, T., Nishida, A., Ishihara, C. (2009) *Babesia microti*-group parasites compared phylogenetically by complete sequencing of the *CCTh* gene in 36 isolates. J Vet Med Sci., J. Vet. Med. Sci. 71: 55-68.
- Fujisawa, K., Nakajima, R., Jinnai, M., Hirata, H., Zamoto-Niikura, A., Kawabuchi-Kurata, T., Arai, S., Ishihara, C. (2011) Intron sequences from the *CCT7* gene exhibit diverse evolutionary histories among the four lineages within the *Babesia microti*-group, a genetically related species complex that includes human pathogens. Jpn. J. Infec. Dis. 64: 403-410.
- Nishisaka, M., Yokoyama, N., Xuan, X., Inoue, N., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Mikami, T. Igarashi, I. (2001) Characterisation of the gene encoding a protective antigen from *Babesia microti* identified it as eta subunit of chaperonin containing T-complex protein 1. Int. J. Parasitol. 31: 1673-1679.
- Russell, C. B., Fraga, D., Hinrichsen, R. D. (1994) Extremely short 20-33 nucleotide introns are the standard length in *Paramecium tetraurelia*. Nucleic Acids Res. 22: 1221-1225.
- Gilson, P. R., Su, V., Slamovits, C. H., Reith, M. E., Keeling, P. J., Mcfadden, G. I. (2006) Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103: 9566-9571.

- Reichard, M. V., Van Den Bussche, R. A., Meinkoth, J. H., Hoover, J. P., Kocan, A. A. (2005) A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of piroplasmids. *J. Parasitol.* 91: 420–426.
- Baldauf, S.L. (2003) Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *TRENDS in Genetics.* 19: 345-351.
- Jinnai, M., Kawabuchi-Kurata, T., Tsuji, M., Nakajima, R., Fujisawa K., Nagata, S., Koide, H., Matoba, Y., Asakawa, M., Takahashi, K., Ishihara, C. (2009) Molecular evidence for the new *Babesia* species in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido, Japan. *Vet. Parasitol.* 162: 241-247.
- Brayton, K. A., Lau, A.O. T., Herndon, D.R., Hannick, L., Kappmeyer, L.S., Berens, S., J., Bidwell, S. L., Brown, W. C., Crabtree, J., Fadrosch, D., Feldblum, T., Forberger, H. A., Haas, B. J., Howell, J. M., Khouri, H., Koo, H., Mann, D. J., Norimine, J., Paulsen, I. T., Radune, D., Ren, Q., Smith Jr., R. K., Suarez, C. E., White, O., Wortman, J. R., Knowles Jr., D. P., McElwain, T. F., Nene, V. M. (2007) Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of Apicomplexan Hemoprotozoa. *PLoS 3*: 1401-1413.
- Kairo, A., Fairlamb, A.H., Gobright, E., Nene, V. (1994) A 7.1 kb linear DNA molecule of *Theileria parva* has scrambled rDNA sequences and open reading frames for mitochondrially encoded proteins. *EMBO J.* 13: 898-905.
- Gray, M.W., Lang, B. F., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Brossard, N., Delage, E., Littlejohn, T. G., Plante, I., Rioux, P., Saint-Louis, D., Zhu, Y., Burger, G. (1998) Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acid Res.* 26: 865–878.
- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J. C., Merino, S., Jefferies, R., Irwin, P. J. (2006) New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Vet. Parasitol.* 142: 238-247.
- Tsuji, M., Wei, Q., Zamoto, A., Morita, C., Arai, S., Shiota, T., Fujimagari, M., Itagaki, A., Fujita, H., Ishihara, C. (2001) Human babesiosis in Japan: epizootologic survey of rodent reservoir and isolation of new type of *Babesia microti*-like parasite. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4316-4322.
- Zamoto-Niikura, A., Tsuji, M., Wei, Q., Nakao, M., Hirata, H., Ishihara, C. (2012) Detection of two zoonotic *Babesia microti*, Hobetsu and U.S. lineages, respectively, in sympatric tick species, *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus*, in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 3424-3430.
- Tabara, K., Arai, S., Kawabuchi, T., Itagaki, A., Ishihara, C., Satoh, H., Okabe, N., Tsuji, M. (2007) Molecular survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* species and *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in wild rodents from Shimane prefecture, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 51: 359-367.
- Piesman, J., Spielman, A. (1980) Human babesiosis on Nantucket Island: prevalence of *Babesia microti* in ticks. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 742-746.
- Liu, Y. (2012) Invasion of *Babesia microti* in Northeastern U.S.A. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-172530>
- Chao, L.-L., Wu, W.-J., Shih, C.-M. (2011) Species identification of *Ixodes granulatus* (Acari: Ixodidae) based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequences. *Exp. Appl. Acarol.* 54: 51-63.
- Kawabuchi, T., Tsuji, M., Sado, A., Matoba, Y., Asakawa, M., Ishihara, C. (2005A) *Babesia microti*-like parasites detected in feral raccoons (*Procyon lotor*) captured in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 825–827.
- Birkenheuer, A. J., Marr, H.S., Hladio, N., Acton, A.E. (2007) Molecular evidence of prevalent dual piroplasma infections in North American raccoons (*Procyon lotor*). *Parasitology*, 135: 33-37.
- Kawabuchi, T., Tsuji, M., Kuwahara, S., Nishida, A., Shimofurutachi, T., Oka, H., Ishihara, C. (2005B) Isolation of a human erythrocyte-adapted substrain of *Babesia rodhaini* and analysis of the merozoite surface protein gene sequences. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 901-907.
- Cornillot E, Hadj-Kaddour K, Dassouli A, Noel B, Ranwez V, Vacherie B, Augagneur Y, Brès V, Duclou A, Randazzo S, Carcy B, Debierre-Grockiege F, Delbecq S, Moubri-Ménage K, Shams-Eldin H, Usmani-Brown S, Bringaud F, Wincker P, Vivarès CP, Schwarz RT, Schetters TP, Krause PJ, Gorenflot A, Berry V, Barbe V, Ben Mamoun C. (2012) Sequencing of the smallest Apicomplexan genome from the human pathogen *Babesia microti*. *Nucleic Acids Res.* 2012. 1–13, doi: 10.1093/nar/gks700
- Saito-Ito A, Tsuji M, Wei Q, He S, Matsui T, Kohsaki M, Arai S, Kamiyama T, Hioki K, Ishihara C, He S, Matsui T, Kohsaki M, Arai S, Kamiyama T, Hioki K, Ishihara C. (2000) Transfusion-acquired, autochthonous human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites with hu-RBC-SCID mice. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4511-4516.